



UNIVERSITA' DI PISA
FACOLTA' DI AGRARIA

Corso di Laurea Specialistica in:
BIOTECNOLOGIE VEGETALI E MICROBICHE

**Analisi delle proteine di riserva di materiali vegetali
antichi utilizzati a scopo alimentare e provenienti da
siti archeologici peruviani**

Candidato:
Martina Landini

Relatore:
Prof. Mauro Durante

Correlatore
Dr. Rodolfo Bernardi

Anno Accademico 2005-2006

CAPITOLO 1	1
LE PROTEINE DI RISERVA	1
CARATTERISTICHE E CLASSIFICAZIONE	1
LE PROTEINE DI RISERVA DEL MAIS	2
<i>Struttura biochimica</i>	2
<i>Regolazione dell'espressione genica nelle prolamine</i>	9
LE PROTEINE DI RISERVA NELLE LEGUMINOSE	11
<i>Sintesi, assemblaggio e trasporto</i>	12
<i>Struttura biochimica</i>	14
<i>Genetica delle proteine di riserva nelle leguminose</i>	19
CAPITOLO 2	21
L'AGRICOLTURA IN MESOAMERICA	21
PHASEOLUS SPP.	21
<i>Phaseolus vulgaris: descrizione botanica</i>	21
<i>Usi e consumo</i>	23
<i>Aspetti ecologici e coltivazione</i>	25
<i>Phaseolus lunatus: descrizione botanica</i>	25
<i>Usi e consumo</i>	26
<i>Aspetti ecologici e coltivazione</i>	27
ZEA MAIS	27
<i>Descrizione botanica</i>	28
<i>Usi e consumi</i>	28
<i>Aspetti ecologici e coltivazione</i>	29
ORIGINE ED EVOLUZIONE DELLA	
DIVERSITA' GENETICA IN PHASEOLUS SPP.	31
DIVERSITA' GENETICA IN PHASEOLUS VULGARIS	31
<i>Domesticazione del pattern andino</i>	32
<i>Domesticazione del pattern mesoamericano</i>	33
DIFFUSIONE IN EUROPA	36
DIVERSITA' GENETICA IN PHASEOLUS LUNATUS	37
ORIGINE ED EVOLUZIONE IN ZEA MAIS	40
CAPITOLO 3	43
I REPERTI ANTICHI	43
I SEMI ANTICHI	43
LA CULTURA NASCA	46
<i>Agricoltura ed alimentazione</i>	47
Alimenti e religione	50
SCOPO DELLA TESI	54

MATERIALI E METODI	55
ESTRAZIONE DA SEMI ANTICHI	58
<i>Primo metodo</i>	58
<i>Secondo metodo</i>	59
ESTRAZIONE PROTEICA DA SEMI DI MAIS	60
QUANTIZZAZIONE DELLE PROTEINE	64
PRECIPITAZIONE DELLE PROTEINE	64
ELETTROFORESI IN CONDIZIONI DENATURANTI (SDS-PAGE)	65
COLORAZIONE E DECOLARAZIONE DEI GEL	67
TECNICHE CROMATOGRAFICHE	67
ESTRAZIONE DEL DNA (CTAB)	68
<i>Protocollo di estrazione</i>	68
<i>Trattamento con RNasi</i>	69
II METODO DI ESTARZIONE	69
<i>Protocollo di estrazione</i>	69
QUANTIZZAZIONE DEL DNA	70
RISULTATI E DICUSSIONE	71
I SEMI MODERNI	71
I SEMI ANTICHI	76
I SEMI ANTICHI: PHASEOLUS SPP	77
I SEMI ANTICHI: ZEA MAIS	81
LE FARINE	86
<i>Estrazione per Phaseolus spp.</i>	86
<i>Estrazione per Zea mais</i>	89
IL DNA ANTICO	92
CONCLUSIONI	95
BIBLIOGRAFIA	97

Capitolo 1

Le proteine di riserva

Caratteristiche e classificazione:

Lo studio scientifico delle proteine di riserva nei cereali risale a 250 anni fa, quando, nel 1745, Beccari riuscì ad isolare la prima glutelina dal grano (Beccari, 1745).

Da quel momento una lunga serie di studi fu portata avanti, grazie anche all'eccellente lavoro di Osborne (1859-1929) che per primo, sviluppò una classificazione delle proteine vegetali sulla base della loro solubilità in diversi solventi: acqua, alcol o soluzioni saline. Le albumine, ad esempio, risultano solubili in acqua, mentre le globuline in deboli soluzioni saline. Nonostante la classificazione di Osborne sia ancora largamente utilizzata, oggi si preferisce suddividere le proteine vegetali in 3 distinti gruppi: le proteine di riserva, strutturali e con funzione protettiva.

All'interno dei semi le proteine di riserva costituiscono la componente principale, mentre le proteine metaboliche o strutturali rivestono un ruolo essenziale nel mantenimento del normale metabolismo cellulare. Per poter essere definite tali, le proteine di riserva devono essere accumulate in notevole quantità durante lo sviluppo del seme e sono rapidamente idrolizzate per fornire l'azoto necessario a supportare la precoce crescita e sviluppo del seme (Doyle *et al.*, 1986; Spencer, 1984). Al contrario delle proteine metaboliche, inoltre, pochi gruppi proteici appartengono alle proteine di riserva e, riprendendo la classificazione di Osborne, possono essere suddivisi in quattro classi principali:

- ALBUMINE: solubili in acqua
- GLOBULINE: solubili in soluzioni saline
- PROLAMINE: solubili in 70-80% di etanolo acquoso
- GLUTELINE: solubili in acidi ed alcol diluiti

In accordo con la classificazione di Osborne, le proteine di riserva risultano suddivise in 3 differenti categorie e la loro localizzazione cellulare comprende altrettanti tessuti all'interno del grano. Sintetizzate durante lo sviluppo dell'embrione, le proteine di riserva sono protette dalla degradazione proteolitica nelle fasi successive al loro immagazzinamento ed immediatamente precedenti la germinazione. Vengono sintetizzate, generalmente, come precursori che vanno incontro a processi co-traduzionali o post-traduzionali, come glicosilazione o rimozione di peptidi, prima di essere definitivamente immagazzinate nei corpi proteici presenti a livello cotiledonare, nelle Dicotiledoni, o dell'endosperma, nelle Monocotiledoni (Spencer, 1984).

Salvo alcune eccezioni, le principali proteine di riserva contenute nei semi delle Dicotiledoni sono globuline. Al contrario, le più importanti componenti proteiche delle Monocotiledoni, con l'unica eccezione dell'*Avena sativa* L., sono essenzialmente prolamine e gluteline (Spencer, 1984).

Considerata l'importanza alimentare dei cereali e delle leguminose, le analisi relative alla caratterizzazione ed alla biosintesi delle proteine di riserva rivestono un ruolo determinante nell'ambito del miglioramento genetico (Doyle *et al.*, 1986). Gli studi, a questo riguardo, sono rivolti essenzialmente a due obiettivi principali: un aumento quantitativo del contenuto proteico nei semi o un miglioramento qualitativo, bilanciando, ad esempio, la composizione aminoacidica, oppure rimuovendo fattori antinutrizionali (Baudoin *et Maquet*, 1999; Bollini *et al.*, 1999).

E' noto, infatti, che il profilo proteico delle leguminose è generalmente sbilanciato, risultando povero di aminoacidi solforati, come la cisteina o la metionina. Al contrario delle albumine, ricche in aminoacidi essenziali, quali la lisina, le globuline sono relativamente povere di questa classe aminoacidica e, in aggiunta, possono contenere alcuni fattori antinutrizionali, come inibitori delle proteasi (Baudoin *et Maquet*, 1999). Programmi di miglioramento genetico (Bollini *et al.*, 1999) uniti allo studio biochimico e molecolare delle proteine di riserva nei cereali e nelle leguminose potrà avere applicazioni dirette nel settore dell'alimentazione umana ed animale. Ed un interesse sempre più crescente si sta rivolgendo, oltre che nel campo dei cereali, anche in quello delle leguminose.

Nei successivi paragrafi verranno prese in considerazione la struttura biochimica, la sintesi e l'accumulo delle proteine di riserva nei cereali, con particolare riferimento al mais, e nelle leguminose, prendendo in considerazione il genere *Phaseolus*.

Le proteine di riserva in mais:

Struttura biochimica:

Globuline di riserva: sono localizzate all'interno dell'embrione e dello strato più esterno dell'aleurone, a livello dell'endosperma. Dal punto di vista biochimico, le meglio caratterizzate sono le globuline del mais, che risultano facilmente solubili in deboli concentrazioni saline e registrano un coefficiente di sedimentazione di circa 7. Possono essere omologhe, per struttura e proprietà biochimiche, alle viciline 7S delle leguminose e mostrano, con quest'ultime una certa similarità di sequenza (Kriz, 1999). Proteine analoghe sono state trovate anche in grano, orzo ed avena, sia a livello dell'embrione che degli strati aleuronici. (Burgess e Shewry, 1986; Yupsanis *et al.*, 1990; Heck *et al.*, 1993). Anche negli embrioni di riso sono state caratterizzate le proteine

7S, ma quest'ultime non mostrano alcuna relazione con le globuline 7S delle altre piante. (Horikoshi e Morita, 1975). La loro funzione è esclusivamente come proteine di riserva e tutte le globuline 7S sono conservate all'interno dei corpi proteici. Nello strato aleuronico, la parte del seme in cui generalmente risiede la maggior parte del contenuto proteico, le globuline non rivestono un ruolo significativo nel conferire le proprietà finali del grano. In alcuni cereali, come il grano, l'aleurone e l'embrione rappresentano soltanto il 10% del peso secco e sono generalmente rimossi prima del consumo per uso alimentare. Nel caso del mais, invece, il solo embrione può raggiungere circa il 10-11% del peso secco e l'alto contenuto in proteine ed oli riveste un ruolo importante per la nutrizione animale. In alcuni cereali, inoltre, l'endosperma amilaceo può contenere globuline 11-12S che possono rappresentare, in riso ed avena, la frazione proteica più consistente dell'endosperma, raggiungendo il 70-80% delle proteine totali. E' stato accertato che queste proteine sono relazionabili a quelle omologhe delle leguminose, presenti anche nella maggior parte delle dicotiledoni (Casey, 1999). Nel caso del riso, inoltre, le globuline 11-12S non risultano facilmente solubili in deboli concentrazioni saline e, pertanto, possono essere classificate come gluteline. Le globuline 11-12S comprendono subunità di massa molecolare di 55 kDa e sono processate a livello post trascrizionale per dare catene polipeptidiche a più basso peso molecolare, unite da ponti disolfuro, rispettivamente di 33 kDa (avena) e 28-31 kDa (riso) per le subunità acide, e di 23 kDa (avena) e 20-22 kDa (riso) per quelle basiche (Shotwell, 1999). Nell'endosperma amilaceo del grano, inoltre, possono essere presenti particolari proteine, relazionabili alle legumine, e denominate triticine. Rappresentano soltanto il 5% delle proteine totali e consistono di 2 catene polipeptidiche a basso (22-23 kDa) ed alto (circa 40 kDa) peso molecolare a formare una struttura dimerica, completamente differente da quella esamerica, tipica, invece, delle legumine (Singh *et al.*, 1988; Singh e Shepherd, 1985).

Prolamine: con l'eccezione del riso e dell'avena, le maggiori componenti delle proteine di riserva nell'endosperma dei cereali sono le prolamine. Questa famiglia proteica deve il suo nome all'alto contenuto in prolina ed in azoto glutammico, ma il rapporto tra questi due amminoacidi può variare dal 30% al 70% delle proteine totali, a seconda dei differenti cereali considerati. Analogamente, la maggior parte delle prolamine sono definite sulla base della loro solubilità in acqua ed alcol (es.: 60-70% (v/v) di etanolo, 50-55% (v/v) di propan-1-olo o propan-2-olo), ma sono noti anche polimeri alcol insolubili. I singoli peptidi, tuttavia, sono sempre solubili in alcol allo stato riducente. Il peso molecolare delle prolamine può variare da 10 a 100 kDa. Considerata l'eterogenità di questa famiglia, rispetto, ad esempio, alle globuline 11-12S, è possibile presupporre che le principali componenti delle prolamine nelle Triticacee

(grano, orzo, segale) e nelle Panicoidee (mais, sorgo, miglio) abbiano avuto una storia evolutiva separata. Due sono le caratteristiche comuni a tutte le prolamine: distinte regioni (o domini) strutturalmente simili, ma con origine diversa, e la presenza di sequenze aminoacidiche basate sulla ripetizione di corti peptidi o sull'aumento nel numero di alcuni residui, come la metionina. Queste caratteristiche sono responsabili del maggior contenuto in glutammina, prolina, ed altri aminoacidi specifici (istidina, glicina, metionina, fenilalanina) in alcuni gruppi di prolamine. Considerata la complessità della famiglia, non è stato facile giungere ad una nomenclatura univoca che comprendesse tutte le frazioni proteiche, ma la crescente disponibilità di sequenze aminoacidiche complete e rappresentative dei maggiori gruppi proteici, ha permesso la riclassificazione delle prolamine sulla base delle loro relazioni strutturali ed evolutive. (Shewry e Tatham, 1990). In accordo con la nuova classificazione, le prolamine delle Triticacee sono state suddivise in 3 gruppi: ricche in aminoacidi solforati (*S-rich*), povere in aminoacidi solforati (*S-poor*) e ad alto peso molecolare (*HMV*). A loro volta, ciascuna classe può essere ulteriormente suddivisa in sottogruppi, che non corrispondono del tutto alle frazioni monomeriche e polimeriche note in grano (rispettivamente le gliadine e le gluteline). Un resoconto delle diverse famiglie proteiche di prolamine in grano è rappresentato nella sottostante tabella:

Table 1. Summary of the types and characteristics of wheat grain prolamins (gluten proteins)

Components	M_r (% total)	Polymers or monomers	Partial amino acid composition (mol%)
HMW prolamins			
HMW subunits of glutenin	65–90 000 (6–10%)	Polymers	30–35% Gly, 10–16% Pro, 15–20% Gly, 0.5–1.5% Cys, 0.7–1.4% Lys
S-rich prolamins			
γ -gliadins	30–45 000 (70–80%)	Monomers	30–40% Gln, 15–20% Pro, 2–3% Cys, <1.0% Lys
α -gliadins		Monomers	
B- and C-type LMW subunits of glutenin ^a		Polymers	
S-poor prolamins			
ω -gliadins	30–75 000 (10–20%)	Monomers	40–50% Gln, 20–30% Pro, 8–9% Phe, 0–0.5% Lys, 0–<0.5% Cys ^b
D-type LMW subunits of glutenin ^a		Polymers	

^aC-type LMW subunits are essentially polymeric forms of α - and γ -gliadins and D-type LMW subunits polymeric ω -gliadins. The B-type LMW subunits constitute a discrete group of S-rich prolamins.

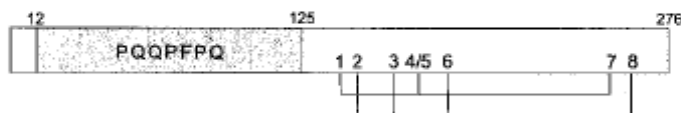
^bCys is present in D-type LMW subunits, but not ω -gliadins.

La figura 1, al contrario, mostra la tipica struttura delle prolamine *S-rich*, *S-poor* e *HMV*:

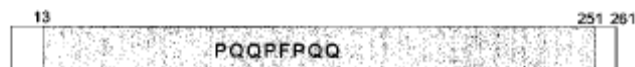
HMW PROLAMIN: HMW Subunit (1Dx5)



S-RICH PROLAMIN: γ -type Gliadin



S-POOR PROLAMIN: ω -Gliadin



Come è facile notare, in ogni gruppo sono presenti sequenze ripetute comprendenti motivi ricchi in prolina o glutammina. Le sequenze ripetute delle γ -gliadine ed ω -gliadine (rispettivamente S-rich prolamin e S-poor prolamin) sono chiaramente relazionate, ma similarità di sequenza sono presenti anche tra i domini non ripetuti delle prolamine S-rich e delle componenti HMV, in particolar modo a livello dei residui cisteinici conservati e di quelli adiacenti. Sulla base di questi dati è stato possibile concludere che i 3 gruppi proteici sono relazionati a livelli evolutivo e, probabilmente condividono un'origine comune. Ulteriori analisi hanno mostrato relazioni evolutive e strutturali comparando le prolamine del riso e dell'avena, le zeine (le prolamine del mais), le albumine 2S delle dicotiledoni, gli inibitori delle α -amilasi, le tripsine ed un certo range di proteine ricche in cisteina a basso peso molecolare (*lipid transfer protein*).

Le relazioni evolutive accertate dimostrano, nei cereali, l'esistenza di una super famiglia di prolamine (Kreis *et al.*, 1985).

Le prolamine del mais: denominate anche zeine, le prolamine del mais comprendono le α -zeine, la componente principale, ed una serie di sottogruppi minori noti come β -, γ -, δ -zeine. (Coleman e Larkins, 1999; Leite *et al.*, 1999). La comparazione a livello delle sequenze aminoacidiche ha dimostrato che le β -, γ -, δ -zeine sono tutti membri della superfamiglia delle prolamine, ma soltanto le γ -zeine contengono ripetizioni aminoacidiche simili (da 2 ad 8 ripetizioni in tandem di Pro-Pro-Pro-Val-His-Leu). In aggiunta, le β -, e δ -zeine sono ricche in metionina, localizzata, nelle β -zeine, a livello del C-terminale. Al contrario, le α -zeine non sembrano relazionate alle prolamine delle Panicoidae e sono formate da 2 sottoclassi principali, classificate sulla base del loro peso molecolare (SDS-PAGE): le zeine con peso molecolare di 19 kDa (Z19) e quelle di 22 kDa (Z22), sebbene il peso molecolare della proteina nativa sia intorno, rispettivamente, ai 23-24 kDa e 25-26 kDa. Entrambe le subunità delle α -zeine possono contenere ripetizioni degenerate di circa 20 aminoacidi, il cui numero può variare da 9 a 10 a seconda, rispettivamente, delle zeine Z19 o Z22. Le α -zeine, inoltre, contengono solo 1 o 2 residui cisteinici e sono presenti come monomeri o oligomeri, mentre le β -, γ -, δ -zeine sono ricche in cisteina e tendono a formare polimeri.

La figura sottostante mostra la struttura delle zeine del mais:

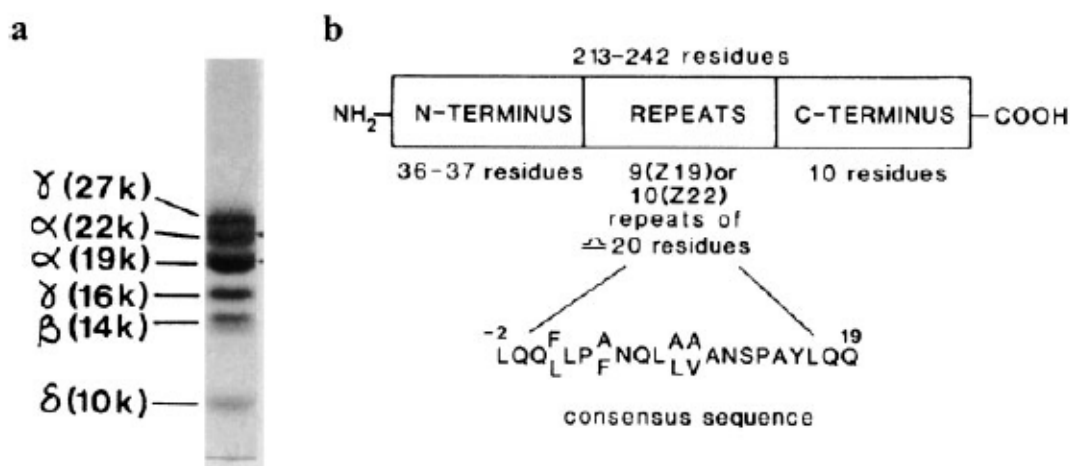


Fig. 2. (a) SDS-PAGE monodimensionale della frazione zeinica di mais. (b) Struttura schematica della M_r 19000 (Z19) e M_r 22000 (Z22) delle α -zeine di mais.

Sintesi, assemblaggio, trasporto, stoccaggio:

Le proteine di riserva sono generalmente prodotte dalla via secretoria e depositate all'interno dei corpi proteici, la cui origine e l'esatto meccanismo di sintesi, trasporto, accumulo, resta ancora, per molti aspetti, da chiarire.

Le globuline 7S e 11S, presenti nell'embrione, nello strato aleuronico e nell'endosperma amilaceo, sono sintetizzate ed accumulate in maniera analoga ai rispettivi omologhi nei semi delle dicotiledoni. La loro sintesi, infatti, avviene a livello del reticolo endoplasmatico rugoso (ER) e, attraverso l'apparato del Golgi, sono organizzate in piccole vescicole che differiscono dai vacuoli litici, anch'essi presenti all'interno dei semi in via di sviluppo. Il preciso meccanismo non è stato ancora chiarito, ma, per la formazione dei densi aggregati vescicolari, sembra essere importante un processo di interazione con l'apparato del Golgi.

Ancora in parte oscuro, al contrario, è il meccanismo di trasporto e accumulo delle prolamine, e due distinti *pathways* sembrano essere coinvolti. In mais, sorgo, miglio e riso, le prolamine sembrano essere accumulate direttamente all'interno del lumen del reticolo endoplasmatico, portando alla formazione dei corpi proteici la cui membrana ha preso origine dal reticolo endoplasmatico stesso (Spencer, 1984). Questo processo porterebbe, in riso, alla formazione di due distinti tipi di corpi proteici: i cosiddetti PB-I, che prendono origine dal reticolo endoplasmatico e contengono le prolamine, e i PB-II, di origine vacuolare e deputati allo stoccaggio di globuline/gluteline. (Yagamata e Tanaka, 1986; Krishnan *et al.*, 1986; Spencer, 1984). Successivi studi, inoltre, hanno messo in evidenza come le prolamine e le globuline/gluteline siano sintetizzate in regioni separate del reticolo endoplasmatico, sulla base della differente distribuzione spaziale dei rispettivi mRNA (Li *et al.*, 1993; Choi *et al.*, 2000). Nel caso dell'avena, invece, le globuline e le prolamine sono collocate all'interno degli stessi corpi proteici, ma le prolamine sono localizzate principalmente a livello delle inclusioni (Lending *et al.* 1989). Gli autori suggeriscono che questi dati risultino dalla fusione di 2 distinti tipi di corpi proteici, uno prende origine dall'ER e che contiene le prolamine, l'altro di origine vacuolare e contenente le globuline.

Se in mais, riso e probabilmente anche nell'avena le proteine di riserva sembrano accumularsi direttamente all'interno dell'ER, con scarse evidenze per un trasporto proteico verso i vacuoli, in grano, orzo e segale queste vie potrebbero essere entrambe presenti. Le triticine, ad esempio, sembrano trasportate ai corpi proteici vacuolari tramite l'apparato del Golgi. (Bechtel *et al.*, 1991). È stato suggerito, inoltre, che i corpi proteici derivanti dal reticolo endoplasmatico possano essere inglobati all'interno dei vacuoli in un processo simile all'autofagia (Galili, 1997). Il preciso meccanismo di fusione, tuttavia, rimane in gran parte oscuro ma il risultato

finale di questo processo è la presenza, nell'endosperma maturo, di una continua matrice proteica che circonda i granuli di amido, alla base della formazione del glutine. Inoltre, il meccanismo che determina la ritenzione di una proteina all'interno del reticolo endoplasmatico o il suo trasferimento verso i vacuoli, tramite l'apparato del Golgi, non è ancora stato chiarito e, sulla base dei dati attuali, non è possibile stabilire se siano presenti specifiche sequenze segnale responsabili dei differenti *pathways*. L'espressione di una forma mutata di γ -gliadina e γ -zeina in sistemi eterologhi ha messo in evidenza come le sequenze ripetute ricche in prolina siano richieste per lo stoccaggio delle proteine di riserva direttamente nel reticolo endoplasmatico (Torrent *et al.*, 1994; Geli *et al.*, 1994; Altschuler *et al.*, 1993; Altschuler e Galili, 1994). E' possibile, pertanto, che queste regioni siano responsabili di interazioni proteina-proteina che portano alla formazione di aggregati insolubili accumulati al livello dell'ER piuttosto che trasportati al vacuolo (Coleman e Larkins, 1999; Shewry, 1999). Nell'endosperma di riso, inoltre, è stato proposto un possibile meccanismo alla base del trattenimento delle prolamine a livello del reticolo endoplasmatico. Il modello prevede il coinvolgimento di un ciaperone BiP (*binding protein*) in grado di legarsi ai polipeptidi nascenti e di trattenerli nel reticolo endoplasmatico fino al loro assemblaggio in corpi proteici (Li *et al.*, 1993b; Muench *et al.*, 1999). Un tale meccanismo, tuttavia, non è stato confermato in nessun altro cereale.

L'organizzazione spaziale delle diverse famiglie di prolamine all'interno dei corpi proteici non è facile da individuare, in virtù del fatto che gruppi di prolamine diversi tendono ad avere proprietà di colorazione simili, poco adatte per un'analisi al microscopio elettronico. Lending e Larkins (1989), tuttavia, sono riusciti ad elucidare, grazie all'utilizzo di anticorpi altamente specifici, le differenti distribuzioni delle zeine all'interno dei corpi proteici, in relazione allo sviluppo dell'endosperma (Lending e Larkins, 1989). Nelle cellule più giovani, lo strato sub-aleuronico dei corpi proteici si divide periclinamente durante lo sviluppo dell'endosperma, in modo tale che le cellule più giovani si trovino nello strato sub-aleuronico, mentre quelle più vecchie occupino la parte centrale dell'endosperma. Generalmente, le cellule dello strato sub-aleuronico sono ricche in proteine, β - e γ -zeine, ma contengono pochi granuli d'amido e di dimensioni più piccole rispetto a quelli situati nella parte centrale dell'endosperma. In questa regione, infatti, i corpi proteici aumentano di grandezza e sono localizzati nelle zone centrali a formare una serie di "loculi" contenenti esclusivamente α -zeina. Mano a mano che lo sviluppo cellulare procede, i loculi tendono a fondersi fra loro fino ad occupare l'intera regione centrale dell'endosperma, mentre le β - e le γ -zeine sono sempre più spinte verso le regioni periferiche.

Le differenti classi zeiniche, inoltre, possono avere un ruolo diretto nella formazione del corpo proteico. Studi di espressione in sistemi eterologhi hanno dimostrato che per l'accumulo

delle α -zeine è richiesta l'espressione delle γ -zeine, mentre le β - e le δ -zeine, se espresse singolarmente, danno origine a corpi proteici anormali (Coleman *et al.*, 1996; Bagga *et al.*, 1997). Da questi studi risulta evidente come restino ancora tutti da chiarire i meccanismi di formazione del corpo proteico e il ruolo dei differenti gruppi proteici nel determinarne la struttura.

Differenze nella distribuzione proteica all'interno dell'endosperma possono occorrere in orzo e, presumibilmente, anche in grano. In entrambi i casi, infatti, le cellule dello strato subaleuronico contengono principalmente le frazioni prolaminiche S-rich e S-poor (B-C ordeina), mentre le componenti HMV (D-ordeina) sono localizzate per lo più nello strato sottostante (Shewry e Halford, 2002; Tecsì *et al.*, 2000). Capire con esattezza la distribuzione proteica all'interno dell'endosperma può rivelarsi importante data la vasta utilizzazione per scopi alimentari del grano e dell'orzo.

Per certi aspetti più chiaro, invece, è il processo che porta alla ri-mobilizzazione delle proteine di riserva a seguito della germinazione. A differenza delle leguminose, nei cereali l'endosperma di un seme a maturità si presenta essenzialmente come un tessuto morto. Perché la germinazione prenda atto, è necessaria la sintesi di idrolasi che, a partire dallo strato cellulare circostante l'aleurone, si diffondono all'interno dell'endosperma. Durante questa fase, le proteine di riserva sono rapidamente idrolizzate e gli aminoacidi risultanti diffondono dallo scutello all'embrione (Spencer, 1984). Durante la fase di formazione del seme, pertanto, si assiste al selettivo accumulo delle proteine di riserva che verranno successivamente idrolizzate durante la fase di germinazione. Questo ciclo di accumulo/idrolisi proteica è fondamentale per la normale fisiologia delle proteine di riserva (Spencer, 1984).

Regolazione dell'espressione genica nelle prolamine:

I geni che codificano per le prolamine sono soggetti ad una regolazione spazio-temporale, essendo espressi esclusivamente nell'endosperma amilaceo e negli stadi tardivi dello sviluppo. La loro espressione, inoltre, può variare considerevolmente a seconda della disponibilità di azoto e zolfo all'interno del grano (Duffus e Cochrane, 1992; Giese e Hopp, 1984). Il controllo dell'espressione genica avviene per lo più a livello trascrizionale, ma poco è ancora conosciuto riguardo la sintesi delle prolamine in risposta alla zolfo (Bartels e Thompson, 1986). Al contrario, in grano, orzo e segale è stato identificato un motivo coinvolto nella risposta all'azoto. La sequenza, detta *N motif* o *nitrogen element*, è presente nei geni per le prolamine S-poor e S-rich, all'interno di una regione altamente conservata, il *prolamin box*, lunga approssimativamente 30 bp e situata 300 bp più a valle rispetto al promotore. Al 3' di questa regione, è situato il motivo di risposta all'azoto, la cui

sequenza consenso, G(A/G)TGAGTCAT, è orientata in senso inverso nei geni per le prolamine S-poor (Shewry e Halford, 2002). E' stato riscontrato, inoltre, che il sito di legame del fattore trascrizionale GCN4, coinvolto, in lievito, nella trasmissione del segnale per l'azoto, mostra similarità di sequenza con il *nitrogen element*, confermando il ruolo dell'azoto nella regolazione trascrizionale dei geni per la prolamina. In aggiunta, le regioni promotrici contengono anche un secondo motivo altamente conservato, il cosiddetto *E motif*, la cui sequenza consenso è la seguente: TGTAAGT (Hammond-Kosak *et al.*, 1993). Studi di espressione in sistemi omologhi hanno confermato che, per basse concentrazioni di azoto, l'*N motif* esercita un effetto negativo sulla trascrizione delle prolamine mentre, al contrario, per livelli di azoto adeguati, l'interazione tra i due boxes conservati, l'*N-* e l'*E-motif*, ripristina l'espressione delle prolamine (Muller and Knudsen, 1993; Hammond-Kosak *et al.*, 1993). Il *prolamin box*, tuttavia, non può considerarsi una caratteristica peculiare dei geni per le prolamine. I promotori delle zeine, ad esempio, contengono una regione conservata di soli 15 bp, probabile elemento chiave nella regolazione tessuto-specifica di questa classe proteica (Quayle e Feix, 1992). All'interno di questa sequenza, non è stata trovata traccia dell'*N-motif* mentre, al contrario, sembrerebbe essere presente una regione molto simile (TGTAAG) all'*E-motif* (Coleman e Larkins, 1999). Solo i promotori delle γ -zeine, al momento, sembrano contenere un motivo analogo al *nitrogen element* ma il suo ruolo non è stato ancora del tutto investigato. Situazione analoga, si prospetta per i promotori delle prolamine HMV. Anch'essi, infatti, sono privi del *prolamin-box* (Shewry e Halford, 2002) ma contengono un elemento regolatore principale (Thomas e Flavell, 1990), la cui sequenza consenso è di 38 bp: 5'-GTTTTGCAAA GCTCCAATTG CTCCTTGCTT ATCCAGCT. La localizzazione di questa regione è altamente conservata in tutti i promotori delle prolamine HMV (Shewry e Halford, 2002) ma la sequenza TGCAAAG non sembra relazionata all'*N-motif*. Al contrario motivi simili alle regioni conservate del *prolamin box* sembrano essere presenti più a valle dell'elemento regolatore principale (Lamacchia *et al.*, 2001), ma la loro delezione non sembra interferire con la regolazione dell'espressione genica, secondo quanto risulta da studi condotti su piante di tabacco transgeniche (Halford *et al.*, 1989; Thomas e Flavell, 1990).

Le proteine di riserva nelle leguminose:

Tra le specie che includono il genere *Phaseolus*, *P. vulgaris* è sicuramente la più studiata per quanto concerne l'analisi delle proteine di riserva. Diversi Autori, ad esempio, hanno messo in evidenza come il contenuto proteico di questa specie rappresenti, nei semi, tra il 20 ed il 30% del peso secco, di cui una frazione considerevole, tra il 40% ed il 60%, è rappresentata dalle globuline, che includono le faseoline, per il 35%-50%, e le lectine che costituiscono, invece, il 5%-10% della frazione proteica totale (Macaya *et al.*, 2001; Vargas *et al.*, 2000; Baudoin e Maquet, 1999; Bollini *et al.*, 1999; Casey e Domoney, 1984). La restante frazione proteica è rappresentata dalle gluteline e dalle albumine, entrambi presenti all'interno del seme in una percentuale variabile tra il 10% ed il 20% (Baudoin *et al.*, 1999). In linea generale, le globuline, la frazione più cospicua nei semi delle leguminose, possono comprendere due differenti tipi proteici: la frazione non glicosilata, con coefficiente di sedimentazione 11 S, e quella, al contrario, glicosilabile con coefficiente 7S. Fanno parte del primo gruppo le proteine leguminosimili (Osborne, 1924; Chrispeels, 1984; Casey e Domoney, 1984), conosciute con denominazioni differenti basate sul nome botanico delle piante da cui sono state purificate (ricordiamo, ad esempio, la "glicinina" da *Glicine Max*). Si presentano, generalmente, sotto forma di esameri privi di carboidrati, il cui peso molecolare si aggira intorno alle 360 kDa (Spencer, 1984 ; Gibbs *et al.*, 1989).

Riconducibili alla frazione 7S, invece, sono le proteine vicilina –simili, che sussistono per lo più in forma di trimeri , con un peso molecolare variabile dai 150 kDa e i 220 kDa (Doyle *et al.*, 1986; Spencer, 1984; Chrispeels, 1984). Anch'esse sono note secondo il nome botanico della pianta di provenienza come, ad esempio, le faseoline, da *Phaseolus vulgaris*, la canavalina da *Canavalia ensiformis* o la conglucina da *Glycine Max*. I pesi molecolari di ciascuna subunità possono variare in maniera inter- ed intra- specifica (Doyle *et al.*, 1986). In *P. vulgaris*, ad esempio, le principali subunità sono 3: la α , il cui peso molecolare varia tra le 51-53 kDa, la β , 47-48 kDa e la γ , dalle 43 kDa, alle 46 kDa. In *Pisum sativum*, al contrario, le proteine di riserva 7S comprendono almeno 6 subunità maggiori, variabili in peso dalle 50 kDa (Chrispeels, 1984) ai 12.5 kDa, in cui le subunità più piccole rappresenterebbero il prodotto di modificazioni post-trascrizionali (Doyle *et al.*, 1986). Il 4-6%, inoltre, delle proteine vicilina-simili, sono legate covalentemente a zuccheri, sotto forma di residui di mannosio (Man) ed N-acetilglicosammina (GlcNa), a formare catene costituite da 2 residui di GlcNa ed otto o nove di Man, legati, a loro volta, ad un residuo di asparagina all'interno della catena polipeptidica (Chrispeels, 1984). La conformazione tridimensionale di queste catene polipeptidiche è oggetto di studio, ma si pensa

essere simile alle catene di mannosio presenti nelle glicoproteine delle cellule animali (Chrispeels, 1984).

Sintesi, assemblaggio e trasporto:

Nel corso del loro sviluppo, i semi delle leguminose sono in grado di accumulare notevoli quantità di proteine di riserva, lectine ed enzimi idrolitici. I siti di accumulo, a livello dei semi maturi, sono i cosiddetti corpi proteici, organuli rivestiti di membrana, dal diametro di circa 1-10 μ m, localizzati nelle cellule parenchimatiche dei cotiledoni (Chrispeels, 1984). Studi sulla loro origine hanno messo in evidenza come i corpi proteici si sviluppino a partire dai vacuoli centrali delle cellule parenchimatiche, non appena la sintesi delle proteine di riserva ha preso atto (Spencer, 1984). Alla luce di queste considerazioni, i corpi proteici si possono considerare, di fatto, come piccoli vacuoli al cui interno vengono immagazzinate non solo proteine di riserva, ma anche lectine e numerosi enzimi idrolitici, a pH acido, come fosfatasi, mannosidasi e ribonucleasi. Il ruolo dei corpi proteici, pertanto, non si limita allo stoccaggio delle proteine di riserva durante le fasi iniziali della maturazione del seme, ma riguarda anche il controllo dell'idrolisi proteica nel corso dello sviluppo del seme (Chrispeels, 1984). L'origine e la formazione dei corpi proteici è piuttosto controversa. Secondo alcuni Autori, i vacuoli presenti nelle giovani cellule parenchimatiche cotiledonari verrebbero del tutto sostituiti da un secondo tipo di vacuoli, più piccoli, che si trasformano nei corpi proteici (Neumann e Weber, 1978). Un'altra ipotesi, invece, non prevede la presenza di due distinte categorie di vacuoli, ma le proteine di riserva verrebbero accumulate all'interno dei normali vacuoli che vanno poi incontro ad una serie di suddivisioni fino alle dimensioni dei corpi proteici (Hoh *et al.*, 1995). Un'ulteriore possibilità, invece, prevede una combinazione dei due modelli esposti: parallelamente alla suddivisione dei vacuoli preesistenti, nuovi vacuoli sarebbero formati a partire dal reticolo endoplasmatico o dalle vescicole dell'apparato del Golgi (Harris e Boulter, 1976). Recentemente, analisi di microscopia elettronica in *Pisum sativum*, sembrano confermare la presenza di due differenti popolazioni vacuolari che si succedono durante lo sviluppo cotiledonare nei semi maturi (Hoh *et al.*, 1995).

Micrografia elettronica delle cellule parenchimatiche nei cotiledoni delle leguminose ha messo in evidenza come in queste cellule il reticolo endoplasmatico sia più esteso, fino a comprendere una fitta serie di cisterne e vescicole (Chrispeels, 1984). Studi in *P. vulgaris* hanno rilevato un incremento nel volume del reticolo endoplasmatico rispetto alla porzione citoplasmatica nei cotiledoni in via di sviluppo, mentre l'analisi del contenuto lipidico e dell'attività del reticolo endoplasmatico confermano l'incremento dell'ER a livello cotiledonare (Bollini e Chrispeels, 1978). Sulla base di questi dati, Barley *et al.* (1970) hanno postulato che il reticolo

endoplasmatico delle cellule parenchimatiche sia il principale sito di sintesi delle proteine di riserva. Numerosi studi, infatti, mostrano che i polisomi che sintetizzano le proteine di riserva sono associati ad organuli dotati di membrana, mentre ulteriori esperimenti hanno dimostrato che i polisomi isolati dal reticolo endoplasmatico sono in grado di dirigere la sintesi proteica *in vitro*. Il trasporto delle proteine di riserva al luogo di accumulo (i corpi proteici, nel caso delle leguminose) può avvenire via lumen, attraverso lo stesso ER, o tramite l'apparato del Golgi (Spencer, 1984).

Appare evidente, pertanto, che le proteine di riserva devono contenere, a livello di struttura, delle sequenze conservate in grado di consentire il trasporto selettivo dal luogo di sintesi a quello di accumulo (Spencer, 1984). Ad esempio, tutte le proteine di riserva ad oggi studiate presentano una sequenza “*leader*” iniziale che sembra facilitare il trasporto del polipeptide nascente all'interno del lumen, attraverso il reticolo endoplasmico (Spencer, 1984; Chrispeels, 1984). Molto, tuttavia, resta ancora da chiarire riguardo l'esatto meccanismo di sintesi, trasporto ed accumulo all'interno dei corpi proteici cui vanno incontro le proteine di riserva.

La ri-mobilitazione delle proteine di riserva a seguito della germinazione, segue fasi diverse rispetto a quanto detto per i cereali. Le differenze risiedono nel fatto che le cellule dell'endosperma e quelle cotiledonari seguono uno sviluppo diverso durante le fasi di crescita del seme. Nei legumi, infatti, si assiste ad un processo di imbibizione che ripristina la normale attività delle cellule cotiledonari (Spencer, 1984) e porta alla secrezione, all'interno dei corpi proteici, di nuove idrolasi, in grado di degradare le proteine di riserva accumulate (Zakharov *et al.*, 2004). A questo proposito, le endopeptidasi rivestono un ruolo importante, portando alla formazione di oligopeptidi, successivamente idrolizzati dalle esopeptidasi ad aminoacidi liberi, possibile riserva di azoto per il seme in procinto di germinare. Alcune peptidasi sono presenti all'interno dei vacuoli, insieme alle proteine di riserva, oppure a livello citoplasmatico e possono agire sugli oligopeptidi soltanto se quest'ultimi sono trasportati all'esterno del vacuolo litico (Zakharov *et al.*, 2004). Le cisteine proteinasi (CPs) sono le più importanti endopeptidasi presenti nei cotiledoni durante i primi stadi di sviluppo del seme e, generalmente, sono considerate le principali responsabili per la mobilitazione delle proteine di riserva. Raggruppano due famiglie: le CPs papaina-simili e quelle legumina-simili, rispettivamente ad alta e bassa specificità per il sito di rottura all'interno del peptide (Zakharov *et al.*, 2004). Recentemente, si è osservato che l'idrolisi della faseolina in *P. vulgaris* avviene grazie all'azione congiunta di 2 enzimi, CPPh1 e LPP, dato, questo, che è stato confermato anche in *Glicine max* (Zakharov *et al.*, 2004). Mano a mano che l'idrolisi procede, i piccoli corpi proteici vanno incontro ad un collassamento, ripristinando il normale assetto del vacuolo centrale (Spencer, 1984).

Struttura biochimica:

Le faseoline: La maggior parte delle proteine di riserva in *P. vulgaris* consiste di proteine 7S, note come faseoline, frazione G1, o Glicoproteine II (Casey e Domoney, 1984).

Tra le componenti più abbondanti in *Phaseolus*, le faseoline sono state oggetto di intensi studi soprattutto in *Phaseolus vulgaris*. Sono considerate, generalmente, più complesse rispetto alla frazione 11S data la loro eterogenicità fisica e serologica, la tendenza alla dissociazione/associazione in risposta al pH, la loro complessità strutturale (Casey e Domoney, 1984). Analisi elettroforetiche in condizioni denaturanti, infatti, hanno messo in evidenza come queste proteine derivino dalla rottura proteolitica di 2 precursori principali, con massa molecolare, rispettivamente, di 54 kDa e 58 kDa (Macaya *et al.*, 2001), e siano costituite da 3 differenti subunità il cui peso molecolare può variare fra le 43 kDa e le 54 kDa (Vargas *et al.*, 2000; Macaya *et al.*, 2001; Casey e Domoney, 1984).

Allo stato nativo, la proteina va incontro a fenomeni di associazione/dissociazione reversibili, pH dipendenti, e, a pH neutro, la forma monometrica mostra un peso molecolare di $1,4 - 1,6 \cdot 10^5$ Da (Casey e Domoney, 1984). In aggiunta è stato riportato come il peso molecolare di ciascuna subunità differisca all'interno delle cultivar al punto che la stessa variabilità elettroforetica (Casey e Domoney, 1984) è stata proposta come possibile marcatore per seguire gli eventi di domesticazione in *P. vulgaris* (Gepts, 1988). La variabilità proteica all'interno dei polipeptidi della faseolina è stata studiata principalmente mediante analisi elettroforetiche mono- e bi-dimensionali.

Tuttavia, la variazione riscontrata all'interno dei pesi molecolari dei rispettivi peptidi, suggerisce che 2 delle regioni coinvolte nella loro sintesi siano polimorfiche. Non è chiaro, tuttavia, se questi polimorfismi siano il risultato di differenze nelle sequenze nucleotidiche che codificano per le faseoline, oppure di differenze nei geni coinvolti nei cambiamenti post- trascrizionali (Sparvoli *et al.*, 1996).

All'interno dello stesso genere *Phaseolus*, quindi, le faseoline mostrano differenti *patterns* elettroforetici. In *P. lunatus*, ad esempio, le faseoline sono costituite da 4 oligomeri maggiori, formati, a loro volta, da due classi di subunità. Il peso molecolare per ciascuna classe è variabile tra i 38.5 kDa e i 32 kDa per la prima classe, e tra i 27 kDa ed i 21 kDa per la seconda (Macaya *et al.*, 2001). Per questa ragione, le faseoline del *P. lunatus* possono essere facilmente distinguibili, mediante SDS-PAGE, da quelle del *P. vulgaris*, del *P. coccineus* e del *P. acutifolius*. Altri Autori, tuttavia, escludono la presenza delle faseoline in *P. lunatus* (Maquet, 1995). Analizzando la mobilità elettroforetica delle proteine di riserva nei 2 *pools* genici, Mesoamericano ed Andino, Maquet (1995) osservò, in *P. lunatus*, l'assenza di bande corrispondenti al peso molecolare delle

faseoline in *P. vulgaris*. Al contrario, alcuni studi (Lioi *et al.*, 1994; Vargas *et al.*, 2000; Macaya *et al.*, 2001) sono stati in grado di caratterizzare ed identificare le proteine di riserva in *P. lunatus*, consentendo l'analisi della differenziazione genetica non solo tra le specie dello stesso genere ma anche all'interno e tra i 2 principali *pools*, il Mesoamericano e l'Andino. A questo proposito, tuttavia, la maggior parte degli studi si è incentrata sulle variabilità genetica all'interno dei principali centri di origine e di differenziazione, mentre pochi lavori hanno preso in considerazione le relazioni filogenetiche all'interno e tra le popolazioni di uno stesso *pool*. Studi sulla variabilità genetica per le faseoline in 36 popolazioni selvatiche della Valle Centrale in Costa Rica, possibile centro di differenziazione di questa specie, hanno messo in evidenza come il contenuto in faseoline sia decisamente minore in *P. lunatus* (circa 35 volte di meno) rispetto a *P. vulgaris* (3.2 vs 112 mg/g) (Vargas *et al.*, 2000). Al contrario, il *P. lunatus* mostra livelli decisamente più alti per quanto riguarda il contenuto in proteine solubili in acqua, se paragonati con i rispettivi valori in *P. vulgaris*. In aggiunta la variazione nel contenuto delle faseoline è maggiore all'interno delle popolazioni di una determinata regione, rispetto alle popolazioni tra regioni diverse. I dati, pertanto, suggeriscono che i cambiamenti ambientali, l'area geografica o la fertilità del suolo potrebbero non essere direttamente responsabili delle variazioni nel contenuto proteico, come era stato in origine proposto da alcuni Autori (Sathe *et al.*, 1984). Al contrario, i cambiamenti su piccola scala, come le differenze nel microhabitat, possono giocare un ruolo determinante nell'accumulo delle proteine di riserva nel *P. lunatus* (Macaya *et al.*, 2001; Vargas *et al.*, 2000). In aggiunta, anche le differenze genetiche potrebbero essere responsabili del diverso contenuto proteico, promosse, ad esempio, dalla discontinuità dell'habitat di crescita del *P. lunatus* (Vargas *et al.*, 2000; Macaya *et al.*, 2001).

Le legumine: le proteine 11S dei semi di leguminosa sono state genericamente definite come proteine oligomeriche, di peso molecolare 300-400 kDa, che comprendono 6 subunità acidiche (α -) ed altrettante basiche (β -) legate fra loro da ponti disolfuro (Casey e Domoney, 1984). La maggior parte delle subunità α ha peso molecolare di circa 40 kDa, mentre le subunità β di circa 52 kDa. Entrambe sono in grado di aggregarsi sotto forma di dimeri α - β . In *Vicia faba* e *Vigna unguiculata*, tuttavia, le subunità della legumina sono in grado di formare dimeri di peso molecolare maggiore, compreso tra i 60 ed i 79 kDa. La proteina 11S più studiata è la legumina di *Pisum sativum*, in cui le subunità acidiche e basiche mostrano eterogenicità in elettroforesi mono- e bidimensionale. L'analisi delle sequenze N-terminali delle subunità basiche ha suggerito l'esistenza, anche in questo caso, di un certo numero di subunità omologhe, confermando la presenza di piccole famiglie geniche. Ulteriori studi, inoltre, hanno messo in evidenza come i

polipeptidi della legumina siano sintetizzati a partire da precursori che contengono entrambe le subunità α - β , in seguito processate per produrre i caratteristici dimeri uniti da un ponte disolfuri. Si pensa, pertanto, che i geni strutturali per la legumina codifichino per le subunità α - β , ma studi dettagliati a questo proposito non sono stati ancora portati avanti. Anche la sintesi e l'accumulo di queste proteine di riserva non sono stati del tutto chiariti. A questo proposito, una legumina di peso molecolare di 80×10^3 Da è stata osservata negli estratti cotiledonari immaturi in *Pisum sativum*, ma sembra essere del tutto assente nei semi maturi. Ulteriori studi per l'accumulo delle proteine di riserva in *Glicine max*, hanno permesso di rilevare, durante lo sviluppo del seme, la presenza di polipeptidi di 83 kDa che vanno incontro ad un rapido *turn over*. Non appena, infatti, vengono tradotte le maggiori subunità acide e basiche della glicina, questi peptidi vengono celermente degradati.

Le conoscenze attuali sul controllo della sintesi delle proteine di riserva non sono ancora complete e gli sforzi si sono indirizzati verso la comprensione degli eventi molecolari associati alla sintesi ed all'accumulo delle proteine di riserva. L'uso di mutanti potrebbe ulteriormente facilitare queste analisi.

Le lectine: Altamente variabili nella loro composizione aminoacidica, le lectine sono proteine glicosilate, presenti in numerosi organi e tessuti di svariate specie vegetali, in modo particolare all'interno di semi e strutture di riserva (Sparvoli *et al.*, 2001; Lioi *et al.*, 1999). Due sono i ruoli principali ad oggi proposti: un possibile meccanismo di difesa nei confronti dei predatori (Sparvoli e Bollini, 1998; Lioi *et al.*, 1999), oltre che un apporto costante di azoto (Hamelryck *et al.*, 1996). Sono tossiche, infatti, per diversi mammiferi e proteggono la pianta nei confronti degli insetti fitofagi. Le arceline, ad esempio, conferiscono resistenza contro *Zabrotes subfasciatus*, mentre le α -AIs sono attive nei confronti di *Callosobruchus maculatus* (Lioi *et al.*, 1999).

Nel fagiolo comune (*Phaseolus vulgaris*), sono state trovate diverse classi proteiche relazionate alla famiglia delle lectine: le arceline, gli inibitori delle α -amilasi (α -AI), e le fitoemagglutinine (PHA), tutte codificate da uno stesso locus ad indicare, a livello genetico, eventi di duplicazione e divergenza da un singolo gene ancestrale (Imbrie-Milligan *et al.*, 1989; Sparvoli e Bollini, 1998; Sparvoli *et al.*, 2001). Anche la sequenza aminoacidica, dedotta a partire dal cDNA, mostra un alto grado di similarità. A questo proposito, un gene codificante per una α -amilasi non attiva è considerato un intermedio evolutivo tra le arceline e le forme attive delle α -AIs.

Nel fagiolo comune, le PHA e le arceline sono proteine glicosilate i cui peptidi maturi possono variare tra i 31 ed i 45 kDa. Le PHA consistono di 2 polipeptidi omologhi, PHA-E (la subunità eritroagglutinante) e PHA-L (la subunità leucoagglutinante), legate in maniera non covalente a formare un tetrametro di circa 120 KD (Hamelryck *et al.*, 1996; Sparvoli e Bollini, 1998).

Allo stato nativo, al contrario, le arceline sono assemblate in dimeri (ad esempio i tipi 1, 2, 5 e 6) o tetrameri (tipi 3 e 4) ed esistono in almeno sei forme elettroforetiche (Hamelryck et al., 1996; Sparvoli e Bollini, 1998). Le componenti maggiori sono le arceline di tipo 1 e 2, rispettivamente di 37 kDa e 35 kDa, la cui sequenza aminoacidica dedotta a partire dal cDNA mostra il 98,5% di similarità (Sparvoli e Bollini, 1998). Le arceline di tipo 3 e 4 sono prevalentemente tetrametri, composti da polipeptidi il cui peso molecolare varia tra le 40-45 kDa, mentre le arceline di tipo 5 consistono di 3 polipeptidi (5a, 5b, 5c) dai 30,8 kDa ai 32,2 kDa, assemblati in dimeri (Lioi et al., 1999). Infine, le arceline di tipo 6 sono strettamente relazionabili alle arceline di tipo 1 e 2 per quanto riguarda la sequenza aminoacidica all’N-terminale, il pI e la massa molecolare (Sparvoli e Bollini, 1998). L’isolamento ed il sequenziamento dei cDNA codificanti per i diversi gruppi di arceline hanno messo in evidenza la presenza di 3 distinti sottogruppi nella famiglia delle arceline: il primo racchiude le arceline di tipo 1, 2 e 6, il secondo quelle di tipo 4 ed il terzo le arceline 5a e 5b (Sparvoli e Bollini, 1998). Sulla base di questi dati il locus genico codificante per le lectine potrebbe rivelarsi un’applicazione utile per l’analisi delle relazioni evolutive all’interno del genere *Phaseolus*.

Per quanto concerne, invece, le α -AI, il secondo gruppo, insieme alle arceline, delle cosiddette “*lectin-related proteins*”, sono proteine vacuolari sintetizzate come precursori glicosilati di circa 40 kDa e processate poi in polipeptidi di 15-20 kDa (le subunità α e β), le dimensioni degli inibitori maturi (Sparvoli e Bollini, 1998; Lioi et al., 1999; Pueyo et al., 1993). Allo stato nativo, le α -AI formano un tetrametro in cui le subunità α e β sono legate insieme in maniera non covalente (Sparvoli e Bollini, 1998). Le arceline e gli inibitori delle α -amilasi possono essere considerate forme incomplete delle PHA, nelle quali, rispettivamente, uno o due *loops*, essenziali per il legame con lo zucchero, sono mancanti, con conseguente perdita della capacità glicosidica (Hamelryck et al., 1996). Le α -amilasi, inoltre, differiscono dalle arceline e dalle PHA anche per il fatto che sono sintetizzate come protoproteine, soggette ad un’ulteriore maturazione proteolitica (Pueyo et al., 1993). Ciascuna α -amilasi, infatti, è sintetizzata sul reticolo endoplasmico come una pre-proteina di 25-28 kDa e, in seguito a glicosilazione, raggiunge i 32-36 kDa e può essere immagazzinata nei corpi proteici, dove va incontro ad ulteriori modificazioni post-traduzionali (Pueyo et al., 1993).

Anche in *Phaseolus lunatus*, è stata riscontrata la presenza di lectine (Imbrie-Milligan et al., 1989; Lioi et al., 1999; Sparvoli et al. 2001.). Nel fagiolo di Lima, ad esempio, le lectine sono in grado di agglutinare solo il tipo A delle cellule sanguigne e sono costituite a partire da 2 subunità di 31 kDa, legate covalentemente da un singolo ponte disolfuro a formare un dimero di 62 kDa (Sparvoli et al., 2001). Sulla base di alcuni *gaps* in posizioni conservate (GAP1-GAP2-GAP3), è

stata dimostrata di recente la presenza, nel fagiolo di Lima, di due importanti lectine, ARL (*arcelin-like protein*) e AIL (inibitori dell' α -amilasi): le sequenze aminoacidiche dedotte indicano similarità, rispettivamente, con le arceline e con le α -AI. A livello dei semi maturi, nel morfotipo Big Lima, ciascuna proteina è costituita da due subunità maggiori che rappresentano due forme glicosilate dello stesso precursore (Sparvoli *et al.*, 2001). Le subunità delle ARL (43 e 46 kDa) e quelle delle AIL (40 e 42 kDa) vengono assemblate in oligomeri di circa, rispettivamente, 125-130 kDa e 80-100 kDa. La sequenza aminoacidica completa delle lectine è stata dedotta a partire dall'isolamento del cDNA corrispondente (Imbrie-Milligan *et al.*, 1989). La proteina matura, consistente di 241 aminoacidi, viene sintetizzata a partire da un precursore che comprende una sequenza segnale di 21 residui aminoacidici. Il confronto con le sequenze di altre leguminose ha messo in evidenza la presenza di regioni altamente conservate coinvolte nel legame con gli ioni metallici Ca^{++} e Mg^{+} o, come nel caso della concavalina A nell'interazione fra subunità proteiche (Imbrie-Milligan *et al.*, 1989). Poco conservati, invece, appaiono i residui cisteinici coinvolti nel legame con i carboidrati confermando l'ipotesi che i residui essenziali nel mantenimento della struttura di base proteica siano altamente conservati, mentre quelli coinvolti nel legame glicosidico possono variare in maniera specie-specifica (Imbrie-Milligan *et al.*, 1989).

Studi sull'organizzazione genetica del *P. lunatus* mostrano che questa specie è stata domesticata in almeno 2 centri, come confermato dall'esistenza di 2 *pools* genici, classificati, in accordo con la definizione proposta da Gepts per *P. vulgaris*, come Andino e Mesoamericano (Sparvoli *et al.*, 2001; Lioi *et al.*, 1999). Le differenze a livello immunologico riscontrate all'interno delle lectine, hanno permesso una prima distinzione tra i 2 *pools* genetici nonché una caratterizzazione proteica delle *lectin-related proteins* in entrambi i gruppi. Il *pool* Mesoamericano comprende le cultivar Sieva e Potato, caratterizzate da semi di piccole dimensioni, mentre il *pool* andino racchiude la varietà Big Lima che, all'opposto, presenta semi di grandi dimensioni (Sparvoli *et al.*, 2001).

Recenti analisi, inoltre, hanno messo in evidenza le variazioni nel profilo proteico delle lectine, in relazione ai 2 maggiori *pools*, il Mesoamericano e l'Andino (Sparvoli *et al.*, 2001; Lioi *et al.*, 1999). I risultati, ottenuti mediante SDS-PAGE in condizioni riducenti o non riducenti, mostrano che le ARL e le AIL del *pool* Andino hanno generalmente un peso molecolare maggiore rispetto a quello Mesoamericano. Ciascuna proteina, inoltre, è visualizzata come una duplice banda, che rappresenta, forse, due forme glicosilate dello stesso polipeptide. Le ARL, inoltre, sembrano essere una componente significativa nel fagiolo di Lima, nonostante fino ad ora siano state osservate solo nelle forme ancestrali, messicane, di *P. vulgaris* e in quelle coltivate di *P. acutifolius* (Mirkov *et al.*, 1994). Polimorfismi per le lectine sono stati osservati sia nelle forme

coltivate che in quelle ancestrali (Lioi *et al.*, 1999). In alcuni varianti del *pattern* Andino, la presenza di più di un monomero per le LBL può indicare una differente glicosilazione di un singolo precursore oppure la presenza di prodotti genici diversi. All'interno delle varietà Mesoamericane, al contrario, non è possibile identificare un pattern particolare per i morfogruppi Sieva e Potato e sono stati descritti morfotipi intermedi tra il Mesoamericano e l'Andino, probabile risultato del prodotto di ibridazione tra i 2 *pools* genici (Lioi *et al.*, 1999).

Genetica delle proteine di riserva nelle leguminose:

Le faseoline sono codificate da due distinte subfamiglie i cui corrispondenti cDNA differiscono in lunghezza per la presenza/assenza di sequenze ripetute, caratteristica, questa, comune a molte proteine di riserva e responsabile dell'eterogenicità osservata nelle legumine di *Pisum sativum* e nelle zeine del mais. I geni corrispondenti ai differenti polipeptidi, mostrano un'ereditarietà di tipo mendeliano (Casey e Domoney, 1984) e la misura diretta del numero di copie per i geni strutturali della faseolina suggerisce, inoltre, la presenza di almeno 4 copie del gene all'interno di un genoma aploide (Casey e Domoney, 1984). Studi analoghi per le subunità α ed α' della conglucina hanno confermato la produzione di questi geni omologhi in *Glycine Max*, rilevando la presenza di piccole famiglie multigeniche. Le faseoline di tipo α , infatti, differiscono da quelle di tipo β per la presenza di sequenze ripetute e le differenze, quindi, riscontrate nella lunghezza del cDNA, potrebbero essere ascrivibili ad eventi di duplicazione o delezione a partire da un gene ancestrale (Kami *et al.*, 1995). Dal momento che il numero di nucleotidi aggiuntivi nel cDNA delle faseoline di tipo α è uguale ai nucleotidi deleti nel cDNA delle faseoline di tipo β è stato proposto che due eventi di duplicazione, occorsi separatamente o simultaneamente, uniti a mutazioni puntiformi, avrebbero dato origine ai geni per le faseoline di tipo α , a partire da un progenitore ancestrale di tipo β (Slightom *et al.*, 1985).

Al contrario, la presenza di un gene che codifichi per il polipeptide γ non è stata riscontrata. Questi peptidi, infatti, sembrano il risultato di modificazioni post-traduzionali, principalmente glicosilazioni, a partire da polipeptidi di tipo β . Per quanto riguarda, invece, il numero di sostituzioni, per le famiglie geniche delle faseoline di tipo α e β , è piuttosto piccolo, se si esclude la presenza di regioni ipervariabili. Queste due famiglie geniche, infatti, differiscono per meno del 2% e si tratta di sole 16 sostituzioni nucleotidiche, 11 delle quali si trovano nella regione codificante, mentre le restanti 5 nella regione al 3' non trascritta. E' interessante notare, infine, che le differenze nucleotidiche tra le famiglie geniche a livello inter/ intra- specifico comprendono più le sostituzioni aminoacidiche che le mutazioni silenti. I risultati sembrano suggerire, pertanto, la presenza di regioni all'interno delle faseoline la cui modificazione non altera la funzionalità biologica della proteina stessa (Slightom *et al.*, 1985).

Misure dirette sul numero di copie geniche per la legumina in *Pisum sativum* suggeriscono, anche in questo caso, la presenza di 4 geni principali a copia singola, ed almeno 3 copie geniche della glicina in *Glycyne max* sono state riscontrate in un genoma aploide. La presenza di queste piccole famiglie geniche potrebbe indicare, a livello evolutivo, la necessità di conservare almeno determinate sequenze geniche, ritenute importanti, per esempio, per il trasporto, sequestro e stoccaggio della proteina stessa. E' possibile, pertanto, ipotizzare che sequenze omologhe si siano evolute a partire da un progenitore comune e siano rimaste conservate nel corso dell'evoluzione per via dell'importante ruolo strutturale nella sintesi, struttura e stabilità delle proteine di riserva. E' stato proposto, inoltre, sulla base della similarità di sequenza tra legumine e viciline, che, a partire da un gene ancestrale, codificante per le regioni ripetute, e mediante meccanismi di ricombinazione o crossing over ineguale, si sia formato un gene simile, come struttura, alla vicilina. Da questo primo evento di duplicazione, avrebbe poi preso origine il gene per le legumine grazie anche ad un reclutamento dei domini N-terminali da una qualsiasi parte del genoma (Gibbs *et al.*, 1989).

Capitolo 2

L'agricoltura nel Mesoamerica

Phaseolus spp.:

Cinque si possono considerare, in senso stretto, le specie domestiche del genere *Phaseolus* che, al contrario, ne include 55. I popoli precolombiani coltivarono questo genere per oltre mille anni come fonte principale di nutrimento e riserva proteica, sia ad uso umano che animale. Già in epoca precolombiana, infatti, il fagiolo comune (*P. vulgaris*) è stato coltivato e selezionato intensamente e gli imperi Inca e Azteco attribuivano a questa specie un'importanza tale da usarla anche come moneta per il pagamento dei tributi. In seguito alla scoperta delle Americhe, la sua popolarità si è accentuata anche nel Vecchio mondo dove, salvo studi isolati, gli sforzi per il miglioramento genetico si sono concentrati soprattutto nei riguardi del *P. vulgaris* e, in minor misura, del *P. lunatus*, o fagiolo di Lima, secondo in Sud America per importanza economica.

La forma ancestrale del *P. vulgaris* cresce nelle regioni subtropicali secche o tropicali, dal Messico all'Argentina, dove sono localizzati la maggior parte degli insediamenti precolombiani, in cui si riuscì a domesticare almeno quattro specie appartenenti a questo genere.

Le cinque forme ancestrali del genere *Phaseolus*, inoltre, si sono probabilmente differenziate in nicchie ecologiche differenti. Studi biochimici e molecolari, infatti (come sarà analizzato più nel dettaglio nei prossimi paragrafi) hanno messo in evidenza come il *P. lunatus* si sia differenziato principalmente in Mesoamerica, mentre il *P. vulgaris* anche nelle regioni Andine.

A livello evolutivo, la pressione selettiva ha portato ad una grande differenziazione per quel che concerne l'habitat di crescita, la forma e la dimensione dei semi.

***Phaseolus vulgaris*: descrizione botanica:**

Il genere *Phaseolus* appartiene alla tribù *Phaseolae*, sottofamiglia *Papilionoidae* e famiglia *Leguminose*. Include 5 principali specie domestiche: *P. vulgaris* (fagiolo comune), *P. lunatus* (fagiolo di lima), *P. acutifolius* (tepary bean), *P. coccineus* ssp *coccineus* (runner bean) e *P. coccineus* L. ssp. *Polyanthus*, ciascuna delle quali mostra una differente distribuzione geografica e storia evolutiva (Singh, 2001).

A livello morfologico, le specie all'interno di *Phaseolus vulgaris* presentano un alto grado di polimorfismo. Generalmente annuali, possono mostrare un portamento eretto, con un'altezza compresa dai 20 ai 60 cm, o prostrato con steli di lunghezza variabili. Le foglie, trifogliate e alterne,

si presentano di colore verde o porpora mentre i fiori, dalle tonalità variabili dal bianco al rosa, sono generalmente portati in racemi ascellari. Grande polimorfismo è presente anche all'interno dei semi e dei baccelli. I primi, infatti, presentano morfologia differente, reniforme, oblunga o globosa, a seconda delle specie considerate e colori che comprendono il grigio, il nero, il bianco, il rosso ed il porpora. I baccelli, al contrario, si presentano cilindrici o piatti, con lunghezza compresa dagli 8 ai 20 cm, e colori differenti: verdi, gialli, nero o porpora.

Le relazioni evolutive del genere *Phaseolus* sono state studiate nel dettaglio attraverso l'utilizzo di marcatori morfologici, biochimici e molecolari che ne hanno confermato l'andamento monofiletico. A livello intraspecifico è stata suggerita la presenza di 2 principali pool genetici, il Mesoamericano e l'Andino che probabilmente riflettono eventi di domesticazione multipla da differenti popolazioni ancestrali. La variabilità morfologica all'interno di ciascun pool è considerevole, al punto che si possono contraddistinguere 6 differenti razze (3 per ogni *pool* genico).

L'habitus di crescita, inoltre, è un ulteriore criterio distintivo sulla base del quale si possono contraddistinguere diverse tipologie: i tipi 1 e 2 presentano un habitus cespuglioso, rispettivamente determinato ed indeterminato; il 3 ed il 4, invece, hanno entrambi un tipo di crescita indeterminato ma, nell'ordine, un habitus semi-prostrato e prostrato. Il sottogruppo Mesoamericano, esteso dal Messico al Centro America, è caratterizzato dalla presenza di semi piccoli e dall'habitus prevalentemente di tipo 2 e 3, raramente di tipo 4 (Beebe *et al.*, 2000). Le specie di origine sudamericana, inoltre, sono meglio adattate, ai climi caldi ed alle basse latitudini. All'interno di questo gene-pool si può distinguere la razza Durango (D), che presenta un habitus di tipo 3, foglie piccole, semi di media dimensione ed una buona adattabilità alle regioni aride del Messico. La razza Jalisco (J), invece, che cresce principalmente nelle aree umide, alle alte latitudini del Messico, presenta, principalmente, un habitus di tipo 4 e semi medi, come nella cultivar Garbancillo Zarca (Beebe *et al.*, 2000). I criteri morfologici, inoltre, permettono la suddivisione in razze anche del pool Andino. La razza Nueva Granata (N), infatti, si caratterizza per un habitus di crescita cespuglioso e semi di grandezza variabile, medi o grandi. Tra le razze andine più coltivate, che comprende la maggior parte delle cultivar a seme grande, può crescere alle latitudini intermedie delle Ande e dell'Africa, nelle zone temperate del Nord America e dell'Europa, oppure a basse latitudini negli ambienti subtropicali del Brasile, del Messico o dei Caraibi. La razza Perù (P), invece, comprende cultivar principalmente adattate alle alte latitudini, sopra i 2000 metri, e con portamento per lo più prostrato, caratteristiche, queste, in comune con la razza Cile (C), coltivata, oltre che nell'omonima regione, anche in Iran, Turchia e Cina. Tratti caratteristici di questa razza

sono la grandezza e la forma dei semi, generalmente di dimensioni medie, circolari o ovali, e dalla colorazione pallida.

La tabella sottostante riassume le principali caratteristiche botaniche ed ambientali delle razze mesoamericane ed andine (Beebe *et al.*, 2000; Beebe *et al.*, 2001).

Andean gene pool			
Races	Morphology	Ecology	Origin
N: Nueva Granada	Bushes Medium to large seeds	Mid-altitudes Warm/temperate climates	Northern Andes
P: Peru	Climbing beans	Highland environments (2000m above sea level)	Perù
C: Chile	Prostrate Medium, rounded to oval, seeds	Higher altitudes (Chile, Turkey, Iran)	Chile
Mesoamerican gene pool			
Races	Morphology	Ecology	Origin
D: Durango	Semi-prostrate Medium seeds	Dry climates	Mexico
J: Jalisco	Prostrate Medium seeds	Wet/highlands	Mexico
M: Mesoamerica	Small seed Indeterminate bush/climbing	Warm lowland	Mesoamerica (Mexico and Central America)

Tab. 2: descrizione delle principali razze, mesoamericane ed andine, di *Phaseolus vulgaris*. (Beebe *et al.*, 2000; Beebe *et al.*, 2001).

Usi e consumo:

Largamente coltivato in tutte le regioni temperate e semitropicali, il fagiolo comune rappresenta una fonte nutritiva di notevole interesse e viene utilizzato principalmente per i suoi baccelli, consumati freschi, sia immaturi che maturi, o seccati che, in alcuni paesi, rappresentano la risorsa proteica principale. La tabella sottostante riassume i principali valori nutrizionali del fagiolo comune:

<u>Categoria biochimica:</u>			%
Proteine			22,9%
Grassi			1,3%
Carboidrati			60,6%
Umidità			12%
Minerali	3,2%,	<i>Ca</i>	260 mg
		<i>P</i>	410 mg
		<i>Fe</i>	5,8 mg
Calorie			346/100g
Vitamine	<i>Tiamina</i>		0,6 ,mg/100
	<i>Riboflavina</i>		0,2 mg/100
	<i>Acido nicotico</i>		2.5 mg/100
	<i>Acido ascorbico</i>		2 mg/100

Tab. 3 : analisi del seme secco della cultivar commerciale “Rajmah”.

La qualità proteica dei semi delle leguminose, tuttavia, non è la stessa dei prodotti animali. In linea generale, nelle leguminose la composizione aminoacidica risulta sbilanciata, essendo eccessivamente povera di aminoacidi solforati, metionina e cisteina, indispensabili da un punto di vista nutrizionale (Baudoin *et al.*, 1999). Alcune varietà, inoltre, possono contenere fattori antinutrizionali, come la tripsina ed inibitori delle proteinasi, che possono dare problemi di tossicità anche se, di norma, scompaiono durante la cottura. L'associazione, infatti, con altri alimenti, come i cereali, può essere una valida strategia all'incremento del valore biologico delle proteine vegetali, ma un'altra alternativa è rappresentata dall'incremento diretto della quantità proteica unito ad un miglioramento qualitativo della composizione aminoacidica (Baudoin *et al.*, 1999). Il problema, che sta prendendo sempre più campo negli ultimi anni, non è di facile soluzione. Il trasferimento genico, infatti, intra- ed inter-specifico è complicato dal fatto che tutti i legumi hanno proprietà biochimiche e nutrizionali simili ed i tratti che influenzano l'aumento quantitativo del contenuto proteico possono essere influenzati da fattori non genetici, rendendo difficile la valutazione del materiale vegetale in analisi. Le ricerche in questo campo, tuttavia, hanno messo in evidenza come la variabilità genetica dei semi per il contenuto proteico totale possa andare incontro a variazioni sostanziali all'interno dei 2 gene-pools (Baudoin *et al.*, 1999). Inoltre è stata stabilita una correlazione diretta, seppur piccola, tra la resa dei semi e la percentuale proteica, mentre meno

significativa risulta la correlazione con il contenuto aminoacidico. Considerato il grande interesse alimentare del genere *Phaseolus*, le ricerche in questo campo sono tutt'altro che concluse.

Aspetti ecologici e coltivazione:

Come accennato, il fagiolo comune cresce principalmente nelle regioni tropicali e temperate, dal momento che un apporto idrico eccessivo può portare all'insorgenza di malattie e, di contro, il freddo causare severi danneggiamenti alle piante. Esistono cultivar a giorno indifferente o a giorno corto e le temperature ottimali per la crescita ricadono, generalmente, tra i 15,6 °C ed i 21,1 °C, con una massima di 27 °C ed una minima di 10 °C. Come tipologia di pianta si adatta bene a terreni ben drenati, ricchi in sostanza organica, ma che non presentino concentrazioni troppo elevate di Al, B, Mn e Na che, sopra certi livelli, possono causare tossicità. Nelle aree temperate, la germinazione è rapida per temperature del suolo intorno ai 18 °C, al punto che la raccolta può avvenire 4-6 settimane dopo la semina. Sono generalmente intercalate, nelle aree tropicali, a piante come il cotone o il caffè, allo scopo di confinare l'insorgenza dei patogeni e di mantenere elevati le rese ed il valore qualitativo del prodotto. Nell'America Latina, il fagiolo comune è intercalato frequentemente con il mais e la produzione, inoltre, è destinata ai suoli marginali, che non richiedano grossi apporti di fertilizzanti.

I principali patogeni, infine, possono essere funghi (per lo più antracnosi), batteri (tra cui: *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Xanthomonas phaseoli*, *Bacterium carotovora* e *Pseudomonas cannabina*) e virus, come il virus del mosaico del fagiolo.

***Phaseolus lunatus*: descrizione botanica:**

Con l'esclusione di poche cultivar, il *Phaseolus lunatus*, o fagiolo di Lima, si può considerare una pianta pluriennale, con germinazione epigea e radici fibrose, caratteristiche, queste, che si ritrovano anche nelle forme non domesticate (Caicedo *et al.*, 1999). Si distingue facilmente per la forma del seme, generalmente a mezza luna, ad eccezione del gruppo di cultivar di origine caraibica. Anche le dimensioni del seme hanno rilevanza tassonomica e riflettono la variabilità delle forme non domesticate. Le cultivar, infatti, possono essere suddivise in varietà a seme piccolo (il peso di 100g di semi si aggira intorno ai 24-70 g), come la Sieva, o a seme grande (in questo caso 100 g di semi possono pesare dai 54 ai 100 g), come la Big Lima. L'habitus può essere cespuglioso oppure strisciante. Sulla base della variabilità del seme si possono contraddistinguere 5 differenti genotipi: la *cultigroup* Big Lima, con semi grandi e piatti ed un *range* di altitudini comprese tra 0-2700 metri; la *cultigroup* Sieva, che presenta semi più piccoli ed è distribuita nelle regioni più calde, tra 1000-1800 metri di altitudine; un gruppo simile al Big Lima ma con semi più piccoli e rotondeggianti ed

un habitat tra i 1800-2400 metri; un ulteriore gruppo noto come “pallares”, con semi ellittici e rotondi, distribuito nelle vallate lungo il fiume Marañon (in Perù), tra i 1800 ed i 2000 metri; un ultimo raggruppamento, infine, simile al primo ma dai semi più piccoli e distribuiti tra i 1800 ed i 2000 metri (Debouck *et al.*).

E' una specie prevalentemente autogama, ma l'impollinazione incrociata non è esclusa e può arrivare a superare il 32%.

Usi e consumo:

Secondo per importanza economica dopo *Phaseolus vulgaris*, il fagiolo di Lima è largamente coltivato in molte regioni tropicali (Moraes *et al.*, 2000). Dal punto di vista nutrizionale viene consumato per uso umano ed animale e rappresenta, come tutte le leguminose, una fonte proteica notevole. A livello aminoacido è ricco in lisina (un aminoacido carente, invece, nei cereali) ma, a questo proposito, valgono le stesse limitazioni accennate per il *P. vulgaris*. La composizione aminoacidica, infatti, risulta povera di aminoacidi solforati e i semi maturi, inoltre, possono contenere fattori antinutrizionali, come l'acido prussico, responsabile della tossicità nel seme crudo. Nonostante la sua importanza economica, per questi motivi nelle aree tropicali si sta progressivamente abbandonando la sua coltura a favore di altre leguminose, come *Vigna unguiculata* (Maquet *et al.*, 1997). Analogamente, le forme non domestiche, spesso insediate nelle aree marginali delle foreste decidue, stanno progressivamente scomparendo, nell'America Latina, a causa della deforestazione e della crescente urbanizzazione. Preservare la diversità genetica del fagiolo di Lima e, contemporaneamente, aumentarne le rese, per esempio con l'insorgenza di varietà resistenti agli stress abiotici, come la siccità e non (Maquet *et al.*, 1997; Moraes *et al.*, 1999), sono fra i *target* del miglioramento genetico per questa coltura.

La tabella sottostante riporta la composizione aminoacidica nelle foglie e nei semi:

Foglie											
Arg	Cys	Gly	Hys	Ils	Leu	Lys	Met	Phe	Thr	Try	Tyr
4,2	-	-	1,3	3,6	6,6	3,6	1,2	7,0	4,0	1,4	-
Semi											
Arg	Cys	Gly	Hys	Ils	Leu	Lys	Met	Phe	Thr	Try	Tyr
6,3	1,1	4,8	3,0	5,6	8,8	6,7	1,7	6,6	4,9	1,0	3,8

Tab. 4 : composizione aminoacidica del *Phaseolu lunatus* espressa come percentuale dell'estratto proteico crudo.

Aspetti ecologici e coltivazione:

Le forme selvatiche, a semi piccoli, sono distribuite dal Messico all'Argentina, ad una altitudine generalmente inferiore ai 1600 metri. Al contrario, le varietà coltivate a seme piccolo crescono frequentemente alle basse latitudini lungo costa Pacifica del Mesoamerica, dall'Arizona e dagli Stati Uniti, alla Colombia ed alla costa ecuadoriana, al Venezuela ed alle Antille. La forma, invece, a semi grandi è distribuita in Ecuador e nel nord del Perù, ad un altitudine compresa tra i 320 ed i 2030 metri. Il *P. lunatus* è una specie prevalentemente rustica che preferisce climi secchi e suoli profondi e ben drenati ed ha una buona resistenza tanto alle alte che alle basse temperature.

I genotipi più precoci possono fiorire 35 giorni dopo la semina e terminano il ciclo in circa 100 giorni. A seconda dei climi e della distribuzione delle piogge, si possono ottenere due cicli di fioritura l'anno. L'apparato radicale profondo, inoltre, conferisce alla pianta una grande vigoria vegetativa, talvolta superiore al mais, ed una sopravvivenza nel suolo fino a 4 anni. Nelle varietà selvatiche i baccelli sono deiscenti e, raggiunta la maturità, si aprono consentendo la liberazione dei semi.

Zea Mais:

Da considerarsi tra i cereali più importanti, il mais è stato domesticato per la prima volta in Sud America e si è diffuso in Europa tra la fine del quindicesimo e l'inizio del sedicesimo secolo.

La sua origine in Mesoamerica risale a 6500 anni fa, come testimoniano i resti delle più antiche pannocchie di mais ritrovate a Guila Naquitz Cave, nella valle Oxaca (Messico) retrodatate a 6500 anni fa. Ulteriori ritrovamenti, per esempio vicino a Tehuacan, Puebla, testimoniano la presenza di mais del 2750 a.C., ma, fino al 1100 a.C., pochi sono i cambiamenti che si registrano a livello morfologico, per quanto riguarda, ad esempio, la forma e le dimensioni della pannocchia. Da questo momento in poi, infatti, la domesticazione del mais procede ad un ritmo sempre più spinto, grazie all'introduzione, ad esempio, di nuove colture e dello sviluppo di varietà precedentemente selezionate. L'inteso lavoro di selezione e di domesticazione ha dato origine all'incredibile variabilità fenotipica che è oggi un tratto distintivo del mais e che lo ha reso una delle coltivazione più importanti per le culture Nord-, Meso-, Sud-Americane e caraibiche. Durante il primo millennio, infatti, il mais si diffuse dal Messico alle regioni Sud-Occidentali degli Stati Uniti, e, da queste, al Sud-est del Canada, trasformando radicalmente il paesaggio agricolo di queste regioni.

Verrà trattato più nel dettaglio, nei prossimi capitoli, il ruolo fondamentale, economico e culturale, che il mais rivestiva per le popolazioni Sud-Americane, nonché la sua importanza alimentare nella dieta di queste culture. In questa sezione, preme soltanto sottolineare, brevemente, l'origine, la diffusione ed importanza economica che tutt'ora questa cultura riveste.

Descrizione botanica:

A livello tassonomico, il mais appartiene all'ordine delle *Poales*, famiglia *Poaceae*, genere *Zea*.

La pianta presenta radici fascicolate, fusto robusto e diritto con nodi evidenti, foglie ampie e guainanti, fiori declini. I fiori maschili sono raccolti in una pannocchia portata all'apice del culmo, mentre i fiori femminili formano una infiorescenza a spiga ingrossata (*spadice*), all'ascella delle foglie e a metà circa del fusto. La fecondazione è prevalentemente incrociata e le cariossidi, riunite a maturità nel tutolo legnoso (volgarmente e impropriamente detto *pannocchia*), assumono una colorazione variabile dal bianco al giallo, all'arancione acceso, al violaceo. Le cariossidi sono disposte in file di numero pari da 8 a 24, ma se ne possono trovare anche di 4 o 48. Ciascun nodo porta una sola pannocchia, più raramente due o tre. Il numero di pannocchie per pianta è variabile a seconda delle cultivar, fino ad un massimo di 23 nella varietà "duro".

Usi e consumo:

Insieme al frumento ed al riso, il mais è tra i cereali più diffusi al mondo. I semi delle diverse varietà sono usati per farine, crusche, mangimi ed anche per la fabbricazione di birra, olio, amido e liquori. Gli usi, pertanto, sono molteplici e possono spaziare dall'alimentazione umana, a quella animale, alla produzione di plastiche ed alcolici. Dal punto di vista nutrizionale, in molte aree di produzione rappresenta una fonte proteica di notevole interesse, ma la sua composizione aminoacidica non risulta carente in alcuni aminoacidi essenziali.

La maggior componente chimica all'interno dei grani è l'amido, che può raggiungere il 72%-73% del peso totale. La componente principale è l'amilopectina (70-75%), mentre l'amilosio rappresenta, nel mais comune, circa il 25-30% dell'endosperma. Altri carboidrati, come glucosio, fruttosio, saccarosio possono essere presenti in percentuali variabili dall'1% al 3%.

Amido a parte, la seconda componente chimica più importante sono le proteine, che rappresentano dall'8 all'11% del peso del grano. La frazione prolaminica, solubile in alcool, è sicuramente la componente proteica più abbondante e contribuisce per il 55% all'azoto totale del grano. Come accennato, tuttavia la composizione aminoacidica del mais risulta sbilanciata, mostrandosi povera di aminoacidi essenziali come la lisina ed il triptofano. La frazione zeinica, infatti, al contrario delle altre, è decisamente povera di questi aminoacidi essenziali, conferendo una bassa qualità

nutrizionale al mais. Se comparati con quelle degli altri cereali, i valori nutrizionali del mais risultano abbastanza simili, a parte, ovviamente, il riso:

Cereal	Protein quality (% casein)
Common maize	32.1
Opaque-2 maize	96.8
QPM	82.1
Rice	79.3
Wheat	38.7
Oats	59.0
Sorghum	32.5
Barley	58.0
Pearl millet	46.4
Finger millet	35.7
Teff	56.2
Rye	64.8

Tab. 5: analisi della qualità proteica in mais.

Considerata l'importanza alimentare del mais, la sua bassa qualità proteica è stata a lungo studiata, e l'incremento in lisina ed in triptofano è oggetto di grande interesse per il miglioramento qualitativo dei valori nutrizionali del mais.

Aspetti ecologici e coltivazione:

E' una delle piante maggiormente coltivate in tutto il mondo, sebbene circa la metà della produzione mondiale sia rappresentata dai soli Stati Uniti. A seguire, Cina, Brasile, Francia, Indonesia e Sud Africa.

Essendo una pianta C4, è più efficiente rispetto ad altre colture nella gestione dei fabbisogni idrici, ma risulta comunque estremamente sensibile alla siccità durante la fase di fioritura. L'umidità del suolo è un fattore determinante nella coltura del mais e periodi eccessivamente aridi, tipici, ad esempio, dei climi africani, possono danneggiare considerevolmente i raccolti. Nel Nord America, questa coltura viene comunemente avvicendata con piante che fissano l'azoto come, ad esempio, le leguminose. La raccolta viene effettuata, generalmente, allo stadio "latteo", in tarda estate, dopo

l'impollinazione, ma prima della formazione dell'amido. Il silo mais, al contrario, viene raccolto quando la pianta è in fase di crescita ed il frutto ancora immaturo.

Generalmente, le forme coltivate di mais sono ibridi F1, che assicurano la miglior vigoria e rendimento quantitativo, sebbene, su questa coltura, siano stati tentati molti approcci biotecnologici, per incrementare, ad esempio, la resistenza a fattori biotici od agli erbicidi.

Origine ed evoluzione della diversità genetica in *Phaseolus* spp.

La domesticazione delle piante può essere definita come un processo, guidato dall'attività umana, attraverso il quale cultivars o landraces sono selezionate a partire da progenitori ancestrali. Sebbene sia stato chiarito che la domesticazione sia un processo dinamico nel tempo e/o nello spazio, individuare i luoghi di origine in cui ha preso atto è di notevole interesse non solo per studi evoluzionistici, ma anche per la conservazione del germoplasma e per il miglioramento genetico delle piante coltivate (Chacon *et al.*, 2005). Uno dei più studiati esempi di domesticazione multipla riguarda, indubbiamente, il genere *Phaseolus*, all'interno del quale gli interessi si sono principalmente rivolti verso *P. vulgaris*, il fagiolo comune, e *P. lunatus*, o fagiolo di Lima (Metais *et al.*, 2000; Papa *et al.*, 2005; Chacon *et al.*, 2005; Beebe *et al.*, 2001; Lioi *et al.*, 1997; Fofana *et al.*, 1999; Maquet *et al.*, 1999).

Composto da almeno 50 specie, il genere *Phaseolus* è distribuito in molte regioni tropicali e subtropicali del Nuovo Mondo, dal Messico all'Argentina. Le complesse relazioni filogenetiche all'interno del genere *Phaseolus* sono state investigate con approcci diversi, dalle caratteristiche morfologiche (Debouck *et al.*; Arraya Villalobos, *et al.*, 2001), ai marcatori molecolari (Maciel *et al.*, 2001; Galvan *et al.*, 2001; Beebe *et al.*, 2001; Fofano *et al.*, 1999; Lioi *et al.*, 1997; Caicedo *et al.*, 1999), e biochimici (Maquet *et al.*, 1997; Esquivel, *et al.*, 1993).

Sulla base di questi studi si è giunti all'identificazione di un complesso *P. vulgaris*-*P. coccineus*, che comprende le varietà coltivate del *P. vulgaris*, *P. coccineus* e *P. polyanthus* Greenman, filogeneticamente distanti dal *P. lunatus*, o fagiolo di Lima, secondo per importanza economica e diffuso in buona parte del Meso- e Centro-America (Fofana, *et al.*, 1997; Caicedo *et al.*, 1999).

Diversità genetica in *P. vulgaris*:

Le specie non domesticate del *P. vulgaris*, presentano una distribuzione geografica ampia ma discontinua, che include il Mesoamerica, nelle regioni comprese dal Messico a Panama, e il Sud America, nelle regioni che si estendono dal Nord-Est della Colombia all'Argentina (Chacon *et al.*, 2005; Aulicino *et al.*, 2001; Maciel, Echeverrigaray *et al.*, 2001; Cattán-Toupance *et al.*, 1998). La mancanza di continuità nella distribuzione di questa specie è principalmente dovuta alla presenza di habitat non idonei, come le aree andine, caratterizzate da altitudini superiori ai 3000 metri, o Centroamericane, dove le altitudini possono essere eccessivamente basse e il clima troppo umido.

Recentemente, anche l'attività umana, come l'agricoltura, l'urbanizzazione e la deforestazione ne ha ulteriormente ridotto e frammentato l'habitat di crescita (Chacon *et al.*, 2005).

La domesticazione del *P. vulgaris* è iniziata in periodi relativamente recenti, più di 4000 anni fa, e si è evoluta indipendentemente nei due principali centri di origine: il Mesoamerica ed il Sud America. La diffusione in queste regioni ha previsto almeno 3 eventi di espansione: il primo che dal Nord delle Ande si è diretto verso l'America centrale, ed i restanti due che a partire dal Mesoamerica si sono indirizzati verso le regioni più a nord del Sud America (Gepts *et al.*, 1986). In seguito alla scoperta delle Americhe, inoltre, il *P. vulgaris* si è diffuso in Europa e in Africa.

Allo stato attuale, l'organizzazione a livello intraspecifico delle varietà coltivate prevede la presenza di 4 razze, per il pool Mesoamericano, (Durango, Jalisco, Mesoamerica e Guatemala) e 3 per quello Andino (Nueva Granada, Perù e Cile), la cui origine è ancora controversa. Non è stato chiarito, infatti, se queste razze siano il risultato di eventi di domesticazione multipla all'interno di una data regione o se, al contrario, derivino da un singolo evento di domesticazione che ha preso campo in ciascuna regione ed ha preceduto la diversificazione in seguito alla coltivazione (Chacon *et al.*, 2005). Il fatto che le 4 razze Mesoamericane e le 3 Andine differiscano notevolmente per adattabilità ambientale, distribuzione geografica e caratteristiche morfo-agronomiche lascia supporre eventi di domesticazione multipla che sarebbero confermati, più recentemente, da analisi mediante marcatori biochimici o molecolari (RAPD, *Random amplified polymorphic DNA*), alloenzimi e proteine di riserva (Galvan *et al.*, 2001; Beebe *et al.*, 2000). Al contrario, la prevalenza di un solo tipo di faseoline, l'S, all'interno delle razze Mesoamericane (Singh *et al.*, 1991) e l'uniformità genetica riscontrata mediante AFLP all'interno delle razze andine, lasciano supporre un singolo evento di domesticazione (Beebe *et al.*, 2001). L'applicazione dei marcatori molecolari e biochimici all'analisi comparative delle specie coltivate e dei loro progenitori ancestrali ha preso recentemente campo nello studio della domesticazione anche all'interno del genere *Phaseolus* (Maciel *et al.*, 2001; Galvan *et al.*, 2001; Beebe *et al.*, 2001; Fofana *et al.*, 1999; Lioi *et al.*, 1997; Caicedo *et al.*, 1999).

Domesticazione del pattern andino:

Nonostante Gepts *et al.* (1986) suggeriscano che la variabilità all'interno delle *landraces* andine indichi eventi di domesticazione multipla, Cattán-Toupance *et al.* (1998) trovarono che 8 delle 21 popolazioni ancestrali di *P. vulgaris* in Argentina mostravano polimorfismi per quanto concerne le faseoline. Un singolo evento di domesticazione, a partire da una popolazione ancestrale polimorfa potrebbe, forse, spiegare la diversità nelle faseoline riscontrata nelle varietà andine. Dati recenti, inoltre, ottenuti mediante AFLP, hanno messo in evidenza come le forme ancestrali andine formino un unico gruppo, relativamente compatto, in cui non è possibile discernere, a livello molecolare, le

tre razze principali: Nueva Granada, Perù e Cile (Beebe *et al.*, 2001). Sulla base di questi dati è stato possibile concludere che probabilmente tutte e tre le razze abbiano una origine in comune e che la loro divergenza sia dovuta, piuttosto, all'intervento della selezione umana. Analisi a livello del DNA cloroplastico (cpDNA) confermano quest'ipotesi, suggerendo un singolo evento di domesticazione per le varietà andine (Chacon *et al.*, 2005). Trentatré delle trentaquattro accessioni studiate, rappresentative di tutte e tre le razze andine, mostrano un solo aplotipo cloroplastico, C, nonostante ne siano stati trovati 8 all'interno delle forme andine non domesticate. L'aplotipo C è uno dei più frequenti tra le forme ancestrali localizzate nel Centro-Sud del Perù, ma è scarsamente rappresentato dalle accessioni di origine Argentina, considerata, insieme alla Bolivia, uno dei potenziali centri di domesticazione (Beebe *et al.*, 2001). In accordo con altri studi, i dati ottenuti analizzando il cpDNA sembrano indicare il Sud del Perù come area di domesticazione, escludendo, al contrario, una possibile origine boliviana, dal momento che, in quest'area, tutte le accessioni studiate presentano l'aplotipo A (Chacon *et al.*, 2005). Contrariamente a quanto appena affermato, analisi AFLP tra le varietà ancestrali e coltivate andine, hanno messo in evidenza come le forme non domesticate situate nel Sud del Perù formino un cluster separato rispetto a quelle non domesticate che, al contrario, sono fortemente raggruppate insieme alle cultivar boliviane e del Nord dell'Argentina (Beebe *et al.*, 2001). Tuttavia, l'uniformità riscontrata tra gli aplotipi cloroplastici suggerisce, come proposto da altri Autori, che le razze andine si siano differenziate principalmente attraverso la selezione umana (Beebe *et al.*, 2001; Chacon *et al.*, 2005). In aggiunta, l'ipotesi di Diamone di una lenta diffusione delle specie coltivate native americane lungo un'asse nord-sud, non sembra poter essere applicabile al *P. vulgaris*. Le evidenze archeologiche, infatti, sebbene molto incomplete, indicano che la domesticazione del *P. vulgaris* sia avvenuta nelle Ande circa 2000 anni prima, rispetto alle regioni Mesoamericane (Kaplan e Lynch, 1999). Le forme domesticate andine, pertanto, si sarebbero diffuse gradualmente al Nord, nelle regioni colombiane, per passare, eventualmente, a quelle mesoamericane (Gepts *et al.*, 1988).

Domesticazione del pattern Mesoamericano:

La distribuzione degli aplotipi cloroplastici tra le varietà mesoamericane suggerisce un'origine più complessa di queste razze rispetto a quelle andine. Le razze Mesoamerica e Durango, infatti, mostrano prevalentemente l'aplotipo K e solo occasionalmente gli aplotipi J, L e I, caratterizzanti, gli ultimi due, rispettivamente le razze Guatemala e Jalisco (Chacon *et al.*, 2005). Tutti gli aplotipi, inoltre, sono stati trovati tra le forme non domesticate, con distribuzione diversa a seconda dell'area geografica. Papa e Gepts (2003) mediante analisi AFLP mostrarono che le differenti razze Mesoamericane sono raggruppate in un unico, grande, cluster, confermando i risultati ottenuti da Gepts (1988) che, osservando la limitata variabilità delle faseoline tra le razze mesoamericane,

suggeriva un singolo evento di domesticazione alla base della differenziazione di queste varietà. La selezione umana, poi, avrebbe contribuito all'ulteriore diversificazione del fagiolo comune nelle razze oggi conosciute.

Unendo a questi dati i risultati ottenuti mediante analisi del cpDNA, tre scenari sembrano possibili: le forme non domestiche ancestrali potrebbero essere state polimorfiche per almeno 3 aplotipi cloroplastici; in aggiunta, o in alternativa al primo modello, mutazioni occasionali possono essersi verificati in una fase successiva alla domesticazione, portando alla duplicazione nelle forme domestiche di aplotipi già presenti in quelle spontanee. Infine, l'incrocio tra forme coltivate e selvatiche potrebbe comunque aver favorito lo scambio di cloroplasti, portando alla presenza di aplotipi diversi (Chacon *et al.*, 2005). Studi sul cpDNA (Chacon *et al.*, 2005), tuttavia, hanno messo in evidenza come in 134 delle accessioni selvatiche studiate, soltanto 3 si siano rivelate polimorfiche nelle regioni cloroplastiche e solo 1 mostrava i due aplotipi predominanti nelle forme mesoamericane domestiche, K e L. Nonostante nello studio di Chacon *et al.* (2005) si prendano in considerazione accessioni rilevate dalla banca dati, piuttosto che popolazioni naturali, (inconveniente, questo, che può portare ad una sottostima della effettiva variabilità naturale) un ulteriore studio sulle popolazioni naturali, non domestiche, della Costa Rica ha confermato i precedenti risultati, mettendo in evidenza la presenza di un singolo aplotipo dominante all'interno dell'area geografica studiata (Gonzalez e Dobouk, 2004; CIAT, dati non pubblicati). Non sembra plausibile, pertanto, l'ipotesi che tutti e 3 i polimorfismi che caratterizzano le razze mesoamericane moderne, siano presenti all'interno di una popolazione selvatica ancestrale, contemporaneamente e in una frequenza tale che non siano persi, per effetto, ad esempio, della deriva genetica, durante i primi stadi della domesticazione (Chacon *et al.*, 2005). Anche l'ipotesi di possibili mutazioni occasionali, occorse in una fase successiva alla domesticazione, non sembra essere del tutto plausibile. Gepts e Debouck (1991) proposero le regioni centro-occidentali del Messico come possibile centro della domesticazione del fagiolo comune. In quest'area gli aplotipi cloroplastici predominanti, all'interno delle popolazioni selvatiche, sono le tipologie K ed L. La derivazione pertanto dell'aplotipo I, caratteristico della razza Guatemala, a partire dagli aplotipi K ed L avrebbe richiesto la presenza di due successive mutazioni indipendenti in una fase di post-domesticazione che si sarebbero poi dovute replicare e mantenere esattamente per dare gli aplotipi K, I ed L che oggi caratterizzano le 3 razze mesoamericane moderne (Chacon *et al.*, 2005). Un'altra possibile spiegazione in grado di riconciliare tutti i dati, potrebbe essere l'ipotesi di una domesticazione multipla, a partire da differenti popolazioni selvatiche (Chacon *et al.*, 2005). Beebe *et al.*, (2000) suggerirono che le varie razze mesoamericane abbiano avuto origine per effetto della selezione variatale, ad opera degli agricoltori, in una fase successiva alla domesticazione. Analisi RAPD,

infatti, mostrano sufficienti differenze tra la razza Mesoamerica, adattata a climi più caldi e latitudini più basse, e le razze Durango e Jalisco, ambientate a latitudine più elevate, suggerendo l'ipotesi di una domesticazione indipendente per questi due gruppi (Beebe *et al.*, 2000). La razza Jalisco, inoltre, potrebbe essere stata domesticata nella regione omonima, dove le popolazioni silvestri presentano, in analogia con le varietà domestiche, le faseoline di tipo S e, a livello cloroplastico, l'aplotipo L. La razza Mesoamerica, caratterizzata dall'aplotipo cloroplastico K, potrebbe essere stata domesticata, invece, in Oaxaca, dove le popolazioni selvatiche mostrano lo stesso aplotipo. Considerazioni simili si possono effettuare per la razza Durango, domesticata molto probabilmente più a nord, nella regione omonima. Una quarta razza, Guatemala, può essere individuata sia mediante analisi del cpDNA che dati RAPD (Beebe *et al.*, 2000; Chacon *et al.*, 2005) e sembra essersi originata nelle regioni meridionali del Messico o in Guatemala. A livello cloroplastico questa razza è caratterizzata dall'aplotipo I, che si ritrova nelle popolazioni silvestri nel Sud del Messico, Guatemala e Honduras, suggerendo l'ipotesi che l'isolamento geografico di queste regioni può aver contribuito alla differenziazione di differenti popolazioni sia domestiche che non (Beebe *et al.*, 2000; Chacon *et al.*, 2005).

Una possibile obiezione all'ipotesi della domesticazione multipla riguarda il fatto che il fagiolo comune si è inserito relativamente tardi nell'agricoltura Mesoamericana (all'incirca 2000 anni fa), prevalentemente incentrata sulla coltivazione del mais e della zucca. Sembra poco plausibile, infatti, che le popolazioni locali abbiano iniziato, indipendentemente l'una dall'altra a domesticare le varietà silvestri di *P. vulgaris*, ma è più facile, al contrario, che questa specie si sia diffusa, all'inizio come una curiosità, da una comunità all'altra (Kaplan e Lynch, 1999). Nonostante il fagiolo comune sia considerato prevalentemente autogamo, gli incroci sono tuttavia possibili sia per le forme domestiche che per quelle silvestri (Thome *et al.*, 1996). Beebe *et al.* (1997) hanno notato che, in Colombia, alcune varietà possono essere considerate come intermedi tra le accessioni di origine Mesoamericana e Andina, presentando, ad esempio, le faseoline di origine andina, ma la morfologia del seme tipica delle varietà mesoamericane. Fenomeni di introgressione tra le varietà mesoamericane ed andine sono stati dimostrati anche mediante analisi RAPD (Beebe *et al.*, 2000) e, pertanto, l'ibridazione accidentale o voluta tra le diverse varietà e le cultivar potrebbe giustificare il trasferimento degli aplotipi cloroplastici, anche se non spiega l'origine di tali polimorfismi. A complicare ulteriormente il quadro, possono essere occorsi fenomeni di trasferimento genico, attraverso il polline, tra le varietà coltivate e silvestri (Papa e Gepts, 2003). Resta da chiarire tuttavia, l'ereditarietà materna del DNA cloroplastico che, in *P. vulgaris* non è stata rigorosamente dimostrata e potrebbe rendere più difficile il trasferimento genico rispetto all'introgressione dei tratti nucleari (Chacon *et al.*, 2005). Il maggior vigore degli ibridi ottenuti, inoltre, potrebbe aver

conferito loro un vantaggio adattativo, nonostante la presenza di alcuni caratteri sfavorevoli come l'apertura del baccello a maturità e la presenza di semi piccoli. Incroci ripetuti potrebbero aver portato ad individui con i tratti caratteristici delle varietà coltivate, ma con gli aplotipi cloroplastici della rispettiva popolazione non domesticata locale (Chacon *et al.*, 2005). Il fatto che razze mesoamericane che differiscono per l'adattabilità ambientale presentino anche aplotipi differenti, può suggerire, inoltre, che nella selezione delle varietà coltivate a partire da forme selvatiche alcuni caratteri si siano mantenuti anche nelle forme domesticate perché strettamente associati a quelli agronomicamente di interesse. Beebe *et al.*, ad esempio, hanno dimostrato che il locus per le faseoline di tipo S è strettamente associato ai fattori che influenzano la grandezza del seme, di modo che la selezione per questo carattere ha portato inevitabilmente anche alla diffusione delle faseoline S in una data regione geografica. Resta difficile, tuttavia, stabilire con certezza quali delle ipotesi proposte (eventi di domesticazione multipla oppure una singola domesticazione seguita da "domesticazioni secondarie", dovute, ad esempio, a fenomeni di introgressione) sia effettivamente la più plausibile per la domesticazione del fagiolo comune. Ci si potrebbe attendere, ad esempio, che le razze che derivino da domesticazioni indipendenti debbano condividere le stesse differenze presenti nelle popolazioni ancestrali di partenza. Al contrario, le razze che derivano da una domesticazione secondaria, dovrebbero essere molto simili in quelle regioni del genoma associate alla sindrome di domesticazione (Chacon *et al.*, 2005). Ulteriori studi della variabilità genetica, attraverso marcatori molecolari o biochimici, possono apportare ulteriori chiarimenti sull'origine e la domesticazione di questa specie.

Diffusione in Europa:

Dopo la scoperta delle Americhe, intensi scambi di materiale vegetale si sono verificati tra il Vecchio ed il Nuovo mondo. Diverse varietà furono introdotte attraverso la penisola iberica, dalla quale si sarebbero poi diffuse al resto d'Europa. Il fagiolo comune arrivò in Spagna e Portogallo dall'America Centrale, intorno al 1500, mentre l'introduzione di accessioni Andine sono occorse probabilmente poco più tardi, in seguito all'esplorazione del Perù da parte di Pizarro (1528). Dopo una prima diffusione in Europa, il fagiolo comune probabilmente arrivò in Turchia ed in Iran intorno al 1600. Successivamente, intorno al diciassettesimo e diciottesimo secolo gli arabi introdussero il *P. vulgaris* nell'Est dell'Africa. I continui scambi fra differenti regioni geografiche rendono difficile stabilire le vie di disseminazione del fagiolo comune dalle Americhe all'Europa, e dall'Europa alle altre regioni mediterranee. Negli anni recenti, i marcatori molecolari hanno aiutato a chiarire l'origine e la disseminazione del *P. vulgaris* dalle aree di domesticazione all'Europa. In particolar modo le faseoline sono state usate per caratterizzare il germoplasma europeo, principalmente in Portogallo, Spagna, Francia e Paesi Bassi. I dati hanno messo in evidenza come il

fagiolo comune europeo derivi dall'introduzione delle forme domestiche sia mesoamericane che andine, con una maggiore prevalenza delle faseoline di tipo andino (76%; T, C ed H) rispetto alle tipologie mesoamericane (24%; S e B). L'unica eccezione è rappresentata dalla penisola ellenica in cui si registra una percentuale relativamente alta per le faseoline S (46%), di origine sicuramente mesoamericana, maggiormente presenti anche in tutta l'area orientale del Mediterraneo (Turchia e Cipro). È stato suggerito, inoltre, che l'espansione dall'America all'Europa ha comportato una riduzione della diversità genetica del fagiolo comune a causa, probabilmente, dell'effetto del fondatore, della diversa adattabilità ambientale e delle preferenze dei consumatori. Inoltre, la struttura della diversità genetica è stata influenzata anche da fenomeni di ibridazione tra i due *pools* genici, uniti alla selezione per l'adattabilità ai nuovi ambienti europei. Una selezione eterogenea, infatti, differente a seconda degli usi e delle pratiche agronomiche locali, potrebbe aver controbilanciato gli effetti negativi della deriva genetica.

Ad ogni modo, dal momento che gli scambi tra il germoplasma mesoamericano ed andino sono stati ben documentati (Gepts *et al.*, 1988), una stretta relazione tra i due *pools* genici e le aree di diffusione europee non può essere stabilita con certezza. Gli ibridi osservati, infatti, potrebbero essersi originati prima nei loro luoghi di domesticazione e solo successivamente essere stati introdotti in Europa. Per ottenere un quadro complessivo dell'origine e della struttura della variabilità genetica del fagiolo comune europeo, occorrerebbe confrontare un numero rappresentativo di accessioni europee ed americane usando, ad esempio, differenti tipi di marcatori biochimici e molecolari.

Diversità genetica in *P. lunatus*:

Recenti studi hanno messo in evidenza come il pool genico primario del fagiolo di Lima possa essere ulteriormente suddiviso in 2 sottogruppi, l'Andino ed il Mesoamericano, riprendendo la terminologia che P. Gepts ha adottato nei riguardi del *P. vulgaris* (Fofana, *et al.*, 1997; Lioi *et al.*, 1999; Maquet *et al.*, 1997; Esquivel, *et al.*, 1993).

I due *pools* presentano una differente distribuzione geografica e specifici patterns elettroforetici per quanto concerne le proteine di riserva. Il sottogruppo mesoamericano, infatti, si estende dagli USA occidentali all'Argentina ed è caratterizzato, a livello morfologico, dalla presenza di semi piccoli, che possono essere piatti, nella varietà Sieva, o rotondeggianti, nella varietà potato (Lioi *et al.*, 1999; Maquet *et al.*, 1997; Esquivel, *et al.*, 1993).

Al contrario, il pool andino è contraddistinto dalla presenza di semi più grandi e piatti, tipici, ad esempio, della varietà Big Lima, ed è distribuito lungo tutta le regioni costiere del Pacifico, dall'Ecuador (specialmente le provincie di Imbabura, Canar, Azuay) alla Bolivia, incluso il Perù e la parte meridionale della Colombia (nelle provincie di Cauca, Huila, Narino) (Fofana, du Jardin *et*

al.,1997; Lioi *et al.*, 1999; Maquet *et al.*, 1997). Varietà intermedie, sono state trovate nelle accessioni coltivate distribuite dal Perù alla Colombia e presentano un pattern proteico, a livello delle proteine di riserva, intermedio (Maquet *et al.*, 1997). Entrambi i sottogruppi includono varietà ancestrali e coltivate, ma le relazioni evolutive all'interno e tra i due gruppi non sono state ancora del tutto chiarite. Secondo Marechal *et al.* (1978), 2 gruppi di varietà ancestrali si pensano relazionati al clado del *P. lunatus*: alcune specie di distribuzione Mesoamericana, come *P. maculatus* Scheele, *P. jaliscanus* Piper, *P. marechalii* Delgado e *P. salicifolius* Piper, ed altre di distribuzione Andina, quali *P. augustii* Harms, *P. bolivianus* Piper, *P. pachyrrhizoides* Harms.

In un ulteriore studio, Maquet (1995) sulla base di polimorfismi biochimici, riscontrati tra gli alloenzimi e le proteine di riserva, ha suggerito una maggiore vicinanza del *P. lunatus* alle varietà ancestrali Andine, rispetto a quelle Mesoamericane, ipotesi, questa, che ha spinto alcuni Autori ad ipotizzare un'origine andina per le specie del *P. lunatus*.

A livello molecolare, pochi studi hanno preso in considerazione specie non domestiche andine e mesoamericane per lo studio filogenetico della specie *P. lunatus*. In un recente lavoro sono state analizzate, mediante RFLP e PCR-RFLP, 22 specie del genere *Phaseolus*, con particolare riferimento al *P. lunatus*, per descrivere la variabilità delle regioni intergeniche del DNA cloroplastico. Da entrambi gli approcci molecolari, i risultati suggeriscono 2 principali gruppi all'interno del genere *Phaseolus*: il primo include *P. vulgaris*-*P. coccineus*-*P. polyanthus*, il secondo il *P. lunatus*. In accordo con altri lavori, quindi, il genere *Phaseolus* non sembra essere monofiletico, ma i risultati indicano la presenza di variabilità intraspecifica a livello del cpDNA. In aggiunta, *P. polyanthus* forma un taxon separato da *P. coccineus* e più strettamente relazionato al *P. vulgaris*, mentre all'interno del *P. lunatus*, le accessioni Mesoamericane formano un clado separato rispetto a quelle andine, confermando l'esistenza di questi 2 pool genici. I dati suggeriscono anche l'esistenza di 2 forme ancestrali, A e B, da cui avrebbero preso origine, rispettivamente, il *P. vulgaris* e il *P. lunatus*. Queste forme ancestrali potrebbero essersi evolute nell'America Centrale, centro di origine o di speciazione del genere *Phaseolus* lungo le catene montuose della Sierra Madre Occidentale e dell'Eje Volcanico Trasversal del Messico, originatesi, rispettivamente, durante l'Oligocene-Miocene e il Terziario superiore o il Pliocene. (Maquet, *et al.*, 1999). La diversità attuale del genere *Phaseolus* potrebbe risalire all'Oligocene, circa 25 milioni di anni fa, o ad un periodo più recente, ad esempio durante l'innalzamento di questi complessi montuosi. (Maquet, *et al.*, 1999). I cicli di glaciazione hanno giocato un ruolo importante nel favorire, mediante la creazione di zone rifugio, gli eventi di speciazione del genere *Phaseolus*.

I cambiamenti climatici che hanno caratterizzato il Pleistocene, pertanto, hanno influenzato grandemente lo sviluppo della flora e delle vegetazione, portando alla formazione, per esempio, di

varianti in grado di adattarsi ad altitudini minori e temperature più elevate (Maquet, *et al.*, 1999). La forma ancestrale B, pertanto, probabilmente caratterizzata da radici tuberose ed adattabilità alle alte altitudini, potrebbe essere migrata gradualmente verso il Sud America portando a varianti, come il *P. maculatus*, *P. marechalii*, *P. ritensis*, *P. salicifolius*, *P. polystachyus*, *P. xolocotzii*, che, centinaia di anni dopo, possono aver formato il terzo *gene pool* del fagiolo di Lima (Fofana *et al.*, 1999; Caicedo *et al.*, 1999.). In Messico, ad esempio, la maggior parte delle specie appartenenti al genere *Phaseolus* sono ben adattate alle alte altitudini, e presentano un sistema radicale tuberoso ed una germinazione ipogea, con le uniche eccezioni delle forme selvatiche di *P. vulgaris* e *P. polyanthus*, caratterizzate da una ristretta distribuzione geografica (Maquet, *et al.*, 1999). La presenza di questa forma ancestrale mesoamericana potrebbe spiegare la distribuzione delle specie selvatiche adattate alle alte temperature e la presenza di taxa con radici tuberose (come *P. augusti* e *P. pachyrrhizoides*) anche nell'area andina (Maquet, *et al.*, 1999). La migrazione di specie mesoamericane adattate ad altitudini superiori ai 2000 metri può essere possibile nonostante le basse altitudini (0-500 metri) presenti in Nicaragua. *P. coccineus*, infatti, è distribuito dal Messico a Panama, nonostante sia meglio adattato ad altitudini elevate, superiori ai 2000 metri (Maquet, *et al.*, 1999). Eventi di speciazione simpatica, favoriti anche dalla natura geografica delle Ande, avrebbero portato, dalla forma ancestrale B alle specie *P. augustii*, *P. pachyrrhizoides*, *P. bolivianus*, *P. lunatus*.

In questi nuovi ambienti, molti genotipi potrebbero avere acquisito semi piccoli (Maquet e Baudoin, 1997) e l'insensibilità al fotoperiodo, caratteristica, questa, che ne avrebbe favorito la diffusione anche alle altitudini del Centro America e del Messico (Maquet, *et al.*, 1999). In accordo con Maquet e Debouck il *P. lunatus*, pertanto, potrebbe essere migrato nelle Ande oppure essersi originato successivamente, a partire da una forma ancestrale, ed evolutosi insieme a *P. augustii*, *P. pachyrrhizoides*, *P. mollis*, specie ristretta alle isole Galapagos.

In aggiunta, sulla base dello scenario proposto, le accessioni a seme piccolo potrebbero aver avuto un'origine andina. Ipotesi, questa, già supportata da Carter sulla base di evidenze archeologiche e confermata sulla base delle relazioni filogenetiche delle forme alleliche ancestrali in *P. lunatus*. Prendendo come riferimento i polimorfismi isoenzimatici ed a livello delle proteine di riserva (Maquet, *et al.*, 1999), in accordo con il modello proposto, le specie ancestrali di origine andina (*P. Pachyrrhizoides*, *P. augusti*, e *P. aff. Bolivianus*) mostrano pattern proteici simili a quelli del *P. lunatus*. Al contrario, le specie ancestrali Mesoamericane (*P. maculatus*, *P. marechalii*, *P. ritensis*, *P. jaliscanus*, *P. salicifolius*, *P. polystachyus*) si dimostrano più simili al *P. vulgaris* rispetto al *P. lunatus*, risultato, questo, che potrebbe spiegare la difficoltà di ibridazione tra i due gruppi. Tuttavia, le relazioni filogenetiche tra le varietà andine e i 2 *pools* genetici del *P. lunatus* non sono

state ancora del tutto chiarite: *P. augusti* e *P. pachyrrhizoides* risultano infatti più simili al pool mesoamericano del *P. lunatus*. Come è stato proposto da Thome *et al.* (1996) in un recente lavoro sul *P. vulgaris*, anche per il *P. lunatus* può ipotizzarsi un'origine andina, secondo il modello sopra esposto.

Per quanto concerne, invece, la forma Mesoamericana del *P. lunatus* potrebbe essersi originata a partire dalle forme alleliche ancestrali andine, dal momento che i pattern proteici, basati sulle proteine di riserva, sono molto simili in entrambi i gruppi.

Un modo migliore per comprendere le relazioni genetiche e gli eventi di domesticazione in maniera intraspecifica può essere dato da una più efficiente organizzazione del germoplasma attuale e della diversità genetica ad oggi disponibile (Lioi *et al.*, 1997; Zoro *et al.*, 1998). Marcatori biochimici e molecolari possono rappresentare uno strumento efficace nello studio delle relazioni filogenetiche all'interno del genere *Phaseolus* (Lioi *et al.*, 1997; Fofana, *et al.*, 1997; Caicedo *et al.*, 1999; Maquet *et al.*, 1997; Esquivel, *et al.*, 1993). Dati ottenuti mediante RFLP all'interno degli spaziatori intergenici dell'rDNA (IGS, *Intergenic spacers*) o tramite analisi RAPD non solo hanno confermato la presenza dei due principali pools genetici, il Mesoamericano e l'Andino, ma hanno anche permesso di contraddistinguere, a livello molecolare, i due differenti genotipi (Lioi *et al.*, 1997; Fofana, *et al.*, 1997). Nel primo caso, inoltre, i dati RFLP hanno permesso di contraddistinguere un terzo cluster, che comprende i fenotipi intermedi alle varietà Sieva e Big Lima e rappresenta, geneticamente, un gruppo distinto. A livello molecolare e fenotipico, pertanto, la presenza di questo terzo gruppo potrebbe essere spiegata assumendo un'evoluzione separata di una forma intermedia in una zona geografica di transizione tra i 2 principali pools (Lioi *et al.*, 1997). La divergenza genetica inoltre, tra i *pools* Mesoamericano ed Andino, potrebbe spiegare la scarsa resa degli ibridi ottenuti dall'incrocio dei 2 gruppi principali (Fofana, *et al.*, 1997). I dati RAPD suggeriscono che la divergenza genetica all'interno del pool Mesoamericano è maggiore rispetto a quella riscontrata nel pool andino (Fofana, *et al.*, 1997) ma, al contrario, l'analisi delle proteine di riserva e l'uso di alloenzimi, mostrano livelli di variabilità simili tra i 2 gruppi (Maquet, 1995). La variabilità, in aggiunta, è maggiore all'interno delle accessioni coltivate che delle forme non domesticate. Questi dati possono essere spiegati suggerendo che gli scambi mediante ibridazione siano più frequenti tra le forme coltivate rispetto a quelle selvatiche, considerata la prevalente autogamia di questa specie (Fofana, *et al.*, 1997).

Origine ed evoluzione di *Zea mays*

La maggior parte delle piante coltivate (riso, cotone, mais, miglio) è stata domesticata in un periodo di tempo compreso tra i 5000 i 10000 anni fa, durante il quale più eventi di domesticazione possono essere occorsi per una singola specie (Matsouka *et al.*, 2002). E' stato il caso, come visto nel genere *Phaseolus*, ed è una delle ipotesi proposte per l'evoluzione del mais, sulla base delle differenze morfologiche e genetiche (Galinat, 1988). Il genere *Zea* contiene le varietà domesticate del mais attuale (*Zea mays* spp. *mays*) ed almeno 6 taxa delle forme non domesticate, tra cui *Z. mays* ssp. *parviglumis*, la più strettamente relazionata, in termini evolutivi al mais coltivato, e *Z. luxurians*, più distante, invece, a livello filogenetico.

Diversi studi sistematici, infatti, hanno messo in evidenza la stretta relazione tra mais e *parviglumis* ed è probabile, pertanto, un possibile evento di domesticazione del mais, avvenuto probabilmente 7500 anni fa, a partire da questa forma silvestre. Sulla base della distribuzione geografica attuale, il luogo di questa presunta domesticazione potrebbero essere le regioni centrali e meridionali del Messico, dove *parviglumis* è principalmente distribuito. Al contrario, la specie *Z. luxurians* è posizionata in una sezione tassonomica differente del genere *Zea* e filogeneticamente distante, quindi, dal mais coltivato. La sua distribuzione geografica, inoltre, comprende un areale più ristretto rispetto a *parviglumis*, localizzato principalmente in Guatemala ed abbastanza isolato, quindi, dal centro di domesticazione ipotizzato per mais e *parviglumis*. Diversi studi hanno cercato di chiarire l'origine e l'evoluzione del genere *Zea*, molti dei quali si sono incentrati sullo studio delle proteine di riserva. In particolar modo, è stata presa in considerazione la proteina GLB1 (globulina) tra le più abbondanti negli embrioni di mais e codificata da un singolo gene localizzato sul braccio lungo del cromosoma 1. La sua espressione è limitata esclusivamente ai tessuti del seme e non sembra avere un ruolo essenziale per lo sviluppo della pianta, dal momento che omozigoti nulli allelici per questa proteina mostrano un normale sviluppo dell'embrione. Considerato inoltre che il rispettivo gene *gbl1* si presenta a singola copia ed è altamente variabile, sulla base di questi presupposti, quindi, il gene *gbl1* è stato proposto come marcatore per lo studio della variabilità genetica in *Zea mays*.

I dati riscontrati hanno messo in evidenza come i livelli di variabilità nelle sequenze geniche dei due presunti progenitori ancestrali, *parviglumis* e *Z. luxurians*, siano diversi: maggiori nel primo, decisamente più bassi in *Z. luxurians*. La divergenza fra questi due taxa, pertanto, dev'essere occorsa tra i 630.000 ed i 700.000 anni fa. Sulla base, inoltre, delle similitudine riscontrate a livello morfologico fra questi due taxa, sembra che la divergenza evolutiva sia occorsa gradualmente, nel corso di centinaia di migliaia di anni. Allo stato delle conoscenze attuali, tuttavia, non è possibile

ipotizzare con certezza se *parviglumis* sia effettivamente il progenitore ancestrale del mais, ma, sulla base delle differenze morfologiche e molecolari, si può comunque ipotizzare un evento di domesticazione a partire dallo stesso *parviglumis*. Ulteriori studi, infatti, sembrano confermare questi risultati (Matsouka *et al.*, 2002). Analisi mediante microsatelliti (SSP) hanno messo in evidenza come, all'interno di teosinte, la sottospecie *mexicana* risulti separata dalle moderne varietà di mais, mentre, al contrario la ssp. *parviglumis* mostra stretta affinità con le varietà di mais coltivate, suggerendo che solo questa sottospecie sia il presunto progenitore del mais (Matsouka *et al.*, 2002). Nonostante, infatti, la domesticazione del mais sembri essere un evento relativamente recente, occorso, probabilmente, 7500 anni fa, le considerevoli differenze fenotipiche tra il mais e i suoi presunti progenitori ancestrali, lasciano presupporre che la diversificazione sia avvenuta ad opera di un'intensa attività di domesticazione e selezione per i caratteri agronomici di interesse. Il fatto, inoltre, che il mais contenga il 71% della variabilità genetica riscontrata in *parviglumis*, lascia ipotizzare un evento di domesticazione alla base della riduzione della diversità genetica. Resta da chiarire, tuttavia, se la domesticazione del mais sia occorsa in un unico evento o se, al contrario, più domesticazioni siano avvenute contemporaneamente in regioni geografiche differenti. Analisi sulle sequenze ripetute hanno messo in evidenza, contrariamente al riso, al cotone ed al fagiolo, un andamento monofiletico all'interno del genere *Zea*, suggerendo, quindi, un singolo evento di domesticazione a partire da un progenitore ancestrale (ssp. *parviglumis*). I dati disponibili a livello isoenzimatico confermano questi risultati, nonostante non includano un numero sufficientemente rappresentativo del germoplasma di mais. Se, come ipotizzato, il mais deriva da un singolo evento evolutivo, è possibile anche localizzare l'origine geografica di questa domesticazione. Sulla base della distribuzione attuale delle popolazioni di teosinte, è stata ipotizzata la regione del “*Basal River Drainage*” come possibile centro d'origine del mais, dal momento che le varietà di teosinte filogeneticamente più vicine a mais derivano da questa località (Matsouka *et al.*, 2002). Occorre precisare tuttavia che la distribuzione attuale di teosinte non è detto corrispondere a quella relativa al periodo della domesticazione e, inoltre, nuove popolazioni di teosinte, vicine a livello evolutivo al mais, potrebbero ancora essere scoperte. Un esempio, è il ritrovamento di varietà di teosinte nel sito archeologico di Taumalipas, regione in cui, oggi, il teosinte sembra essere del tutto assente (Wilkes, 1967). A partire da questo evento di domesticazione iniziale, fenomeni di introgressione da altri tipi di teosinte potrebbero aver contribuito a dare origine alla diversità genotipica e morfologica rilevabile in mais (Matsouka *et al.*, 2002). In questo caso la sottospecie *Zea mexicana* sembrerebbe essere stata il fattore determinante all'origine della diversità attuale in mais (Matsouka *et al.*, 2002). Al contrario della ssp. *parviglumis*, che cresce alle basse latitudini e raramente ibrida con mais, la ssp. *Mexicana*, è ambientata ad altitudini superiori ai 1700 m del Messico Centrale e Settentrionale,

e, frequentemente, ibrida con il mais attuale (Matsouka *et al.*, 2002). Le stesse osservazioni di campo, inoltre, suggeriscono che il trasferimento genico dalla spp. *mexicana* al mais può aver contribuito alla creazione di alcune razze messicane del mais.

Gli stati di Oaxaca e Jalisco, inoltre, sono i probabili centri di diversificazione geografica del mais. Le varietà di mais, infatti, che sono più strettamente relazionate a *parviglumis* derivano da questa regione e, in aggiunta, il più antico ritrovamento archeologico di mais è localizzato nelle alte altitudini della regione di Oaxaca. Due modelli sulla diversificazione del mais sono stati proposti: il primo prevede che il mais si sia diffuso dapprima nelle alte altitudini, dove, fra l'altro, risiedono i principali ritrovamenti archeologici, per poi espandersi nelle regioni a latitudini minori. Una diffusione inversa, invece, è prevista dal secondo modello basato sulla considerazione che fitoliti trovati nelle regioni a più bassa altitudine siano la rappresentazione delle più antiche forme di mais (Matsouka *et al.*, 2002). Tuttavia, analisi sulle sequenze ripetute (SSR) sembrano confermare la prima ipotesi per la diversificazione del mais. Ma se la domesticazione è associata ad una rapida divergenza morfologica, come constatato in *Zea mays*, di contro la bassa divergenza riscontrata tra i due progenitori ancestrali, *parviglumis* e *Z. luxurians*, lascia supporre un processo di diversificazione molto più lento, che ha compreso almeno 10000 anni ed è stato accompagnato dalla graduale perdita di diversità genetica in *Z. luxurians* senza, tuttavia, portare ad una considerevole differenziazione morfologica. Nonostante queste considerazioni, Eubanks (1997) propose un evento di ibridazione tra le specie perenni di *Zea* ed il *Tripsacum dactyloides* all'origine del mais moderno. Secondo questa teoria, le sequenze nucleotidiche per il gene *glb1* dovrebbero condividere polimorfismi con quelle di *T. dactyloides* e le specie del genere *Zea*, dati, questi, che non sono stati confermati dalle analisi genetiche.

La diffusione del mais, infine, alle restanti regioni americane, sembra essere avvenuta mediante due linee di dispersione principali: il primo orientato dal Messico nord-occidentale alle regioni sud-occidentali degli Stati Uniti, e, da queste, al Canada; il secondo diretto dal Messico al Guatemala ed alle isole Caraibiche e, da queste, al Sud America ed alle regioni Andine.

Capitolo 3

I reperti antichi

I semi antichi

I primi studi sulle proteine di riserva sui semi antichi risalgono agli anni '40 (Barton-Wrigth *et al.*, 1944), ma le difficoltà nel reperire il materiale archeologico ed i problemi connessi alla stato di conservazione ed all'analisi dei reperti vegetali, hanno limitato gli studi in questo settore.

Recentemente, tuttavia, un rinnovato interesse nel comprendere i centri di origine e di domesticazione delle principali specie coltivate, importante non solo a livello filogenetico, ma anche antropologico-culturale, sta di nuovo prendendo campo ed il ritrovamento archeologico di semi ed alimenti antichi può essere di notevole aiuto in questo settore. Le aree di ricerca, a tal proposito, prevedono una compartecipazione di approcci diversi: archeologici, paleobotanici e, più recentemente, molecolari.

L'utilizzo infatti di marcatori biochimici o molecolari ha permesso di mettere in luce l'origine di alcune delle più importanti specie coltivate (tra le quali: il mais *Zea mays*, il fagiolo *Phaseolus vulgaris*), anche con il contributo dei paleobotanici, indispensabile nell'identificazione dei tratti morfologici (Piperno *et al.*, 2000; Piperno *et al.*, 2004; Benson *et al.*, 2003).

Studi fenotipici su materiale vegetale archeologico sono stati utili nel tracciare il cammino evolutivo del mais, durante le varie fasi della sua domesticazione. Nel corso dell'evoluzione, infatti, le pannocchie del mais hanno subito una notevole differenziazione in termini di dimensioni, forma e colore, risultato di una coltivazione intensa e selettiva e di ripetuti scambi di materiale genico con varietà selvatiche, quali, ad esempio, il *Teosinte* (Jaenicke-Despres, 2003). La più antica, indiscussa, evidenza archeologica della domesticazione del mais risale a 6250 anni fa anche se recenti dati molecolari, tuttavia, datano la domesticazione del mais intorno ai 9000 anni fa, probabilmente nel Sud del Messico, nella Balsa River Valley (Matsouka *et al.* 2002). A livello morfologico, inoltre, le evidenze archeologiche suggeriscono che le prime pannocchie di mais mostravano un aumento nel numero di file delle cariossidi ed una riduzione nella dimensione del glume. Nel corso dell'evoluzione, presumibilmente intorno ai 5500 anni fa, la grandezza della cariosside incominciò gradualmente ad aumentare, ma poco è noto sulle altre caratteristiche fenotipiche, come la morfologia completa della pannocchia, l'architettura della pianta ed il contenuto in amido (Jaenicke-Despres, 2003).

Il fatto che, inoltre, i geni *pbf* e *su1*, coinvolti nella determinazione del contenuto proteico e nella qualità dell'amido, portassero gli stessi alleli del mais moderno già 4400 anni fa sta ad indicare che

la qualità del seme e la grandezza della pannocchia siano stati tra i primi target del processo di selezione e domesticazione umana (Jaenicke-Despres, 2003). Datazioni al radiocarbonio, mediante spettrometria di massa (AMS, *accelerator mass spectrometer*) sulle più antiche pannocchie di mais ritrovate in Messico, datano l'evento di domesticazione del mais a 6300 anni fa (Piperno *et al.*, 2000; Benz *et al.*, 2000). La scoperta è stata effettuata nella cava Guilà Naquitz, vicino alla città di Oxaca, nel Sud del Messico, situata a 400-500 km più ad est della Balsa River Valley, ad un'altitudine di 1926 metri (Piperno *et al.*, 2000; Benz *et al.*, 2000). Come già accennato, le evidenze archeologiche, pertanto, confermano una possibile origine del mais a partire dalle zone montagnose del Sud del Messico.

L'utilizzo di isotopi radioattivi è stato invece proposto, per la localizzazione geografica dei luoghi di coltivazione del mais nelle società precolombiane dal IX al XII secolo a.C. (Benson *et al.*, 2003). Le evidenze archeologiche, infatti, nella regione del Chaco Canyon, in Messico, hanno permesso di ricostruire il sistema delle "Great Houses", edifici monumentali, utilizzati come probabili depositi delle ricchezze accumulate (vegetali prevalentemente). La coltivazione del mais era di cruciale importanza nella dieta dei nativi americani del Chaco Canyon e capire dove il mais sia stato maggiormente coltivato può rivelarsi di fondamentale importanza nello stabilire i luoghi di importazione di questa coltura e le relazioni commerciali tra le differenti "Great Houses" nel bacino di San Juan (Benson *et al.*, 2003). Assumendo che la chimica degli isotopi radioattivi ($^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$) riscontrati nella pannocchia possa riflettere quella degli isotopi nei suoli di coltivazione, la provenienza del mais pre-Colombiano è stata accertata. Benson *et al.* (2003), asseriscono che il mais importato a Chaco Canyon con molta probabilità veniva coltivato nelle vicine regioni di San Juan o del fiume Animas, confermando gli scambi commerciali, anche su distanze considerevoli, nelle civiltà precolombiane e come l'importazione del mais fosse un elemento indispensabile per la struttura sociale delle "Great Houses" (Benson *et al.*, 2003). Nonostante il mais sia, indubbiamente, la specie più coltivata nell'America centrale, evidenze archeologiche risaltano anche l'importanza del fagiolo comune (*Phaseolus vulgaris*) in queste regioni: ma gli studi, a questo proposito, sono piuttosto scarsi.

Come accennato nei precedenti capitoli, gli studi di Gepts, basati sull'analisi delle proteine di riserva, hanno permesso di identificare il progenitore ancestrale del fagiolo comune nella regione di Jalisco, ma pochi lavori hanno preso in considerazione reperti antichi e moderni (Smith, 2001).

I ritrovamenti archeologici del fagiolo comune in Messico sono datati intorno ai 2300 anni fa e risultano localizzati, principalmente, nella valle di Tehuacàn, 700 km a Sud-est di Guadalajara, suggerendo un possibile evento di domesticazione in queste località (Smith, 2001). I dati archeologici, tuttavia, non sono ancora completi: poche regioni, infatti, sono state investigate nel

dettaglio ed ulteriori ritrovamenti archeologici sembrano necessari per chiarire l'origine del fagiolo comune, in Sud America. In un precedente lavoro, Paolozzo e Jaffè (1965) riscontrarono delle differenze, nella frazione proteica solubile in soluzioni saline, fra campioni archeologici e moderni di *P. vulgaris*. Nei primi, infatti, in seguito ad immuno-elettroforesi, era evidenziabile solo una debole banda diffusa, mentre l'attività emoagglutinante si poteva rilevare solo per campioni di circa 1000 anni. Attraverso analisi di microscopia elettronica, Derbyshire *et al.* (1977) osservarono che i tessuti endospermatici delle cariossidi di mais antiche risultavano ancora intatti. Il contenuto proteico ed amilaceo, inoltre, presentava similitudini con i campioni attuali, mentre, al contrario, i tessuti embrionali erano molto danneggiati e, in alcuni casi, completamente distrutti. L'estrazione proteica a partire da semi interi, mummificati, mise in evidenza, per la prima volta, come i patterns proteici tra i semi antichi e moderni fossero molto simili, al punto da poter essere confrontabili fra loro. Nei semi antichi, tuttavia, le frazioni più conservate risultarono quelle zeiniche e gluteliniche e l'analisi aminoacidica confermò questi risultati. Nel mais antico, il contenuto di lisina e metionina risulta più basso, mentre è più alto quello in leucina. Risultati, questi, spiegabili con il fatto che le gluteline contengano un maggior contenuto di lisina e metionina rispetto alle zeine. In uno studio più recente, Durante *et al.* (1994) sono riusciti ad isolare cinque frazioni proteiche dai semi antichi di mais, datati 250 +/- 50 a. C., e recuperati da un sito archeologico peruviano. Solo le frazioni zeiniche e gluteliniche, tuttavia, sono risultate quelle meglio conservate, in accordo con i risultati ottenuti da Derbyshire *et al.* (1977) che indicano le frazioni zeiniche come le più abbondanti e le meglio conservate nei semi di mais. In particolar modo, dai risultati ottenuti, le subunità zeiniche 22 e 20 kDa sembrerebbero le meglio conservate, mentre quelle di 15-10 kDa risultavano diversamente rappresentate.

Il confronto aminoacidico e proteico è stato portato avanti anche tra cariossidi di orzo, datate intorno al 1000-3000 a.C. e ritrovate in un sito archeologico egiziano, e campioni moderni di controllo (Shewri *et al.*, 1981). Dal punto di vista della composizione aminoacidica, notevoli similitudini si poterono riscontrare con i campioni moderni dimostrando che, in buone condizioni di conservazione, la degradazione aminoacidica è molto lenta. La presenza di ordeine o globuline, tuttavia, non è stata rilevata né per mezzo di elettroforesi, né mediante analisi con anticorpi. Risultati, questi, spiegabili ammettendo un alto grado di degradabilità proteica e un cambiamento nei livelli di solubilità che potrebbe aver alterato la composizione aminoacidica della frazione di Osborne. Zeven *et al.* (1975), infatti, stimarono che l'età massima per ritrovare proteine in semi d'orzo fosse tra i 125 ed i 175 anni.

Ma studi a livello nucleotidico, oltre che proteico, stanno tutt'oggi prendendo campo (Goloubinoff *et al.*, 1993; Rollo *et al.*, 1991; O'Donoughe, Brown *et al.*, 1994). Recentemente, infatti, è stata

amplificata la sequenza genica corrispondente per l'aldeide deidrogenasi (*Adh*) in campioni di mais antichi provenienti da differenti siti archeologici del Perù, del Cile e del Messico (Goloubinoff *et al.*, 1993). Le sequenze nucleotidiche, paragonate con quelle di mais e teosinte moderni, hanno messo in evidenza come il mais sia stato domesticato in Centro-America a partire da una singola forma ancestrale o, in alternativa, da una popolazione di progenitori ancestrali che conteneva un alto grado di polimorfismo allelico. Fenomeni di domesticazione multipla da più varietà selvatiche di teosinte non sono esclusi (Goloubinoff *et al.*, 1993).

Studi recenti sono stati condotti anche in grano (Brown *et al.*, 1994), in campioni di *Triticum spelta*, datati intorno al primo millennio a.C. per le sequenze alleliche gluteliniche ad alto peso molecolare (HMV). I risultati incoraggianti suggeriscono che è possibile studiare la variabilità genetica in reperti archeologici, ma il grado di purezza del DNA ottenuto, la sua degradabilità, quindi il rischio di ottenere degli artefatti, sono, ancora oggi, fattori limitanti.

La cultura Nasca

I semi antichi e i depositi farinosi utilizzati nel presente lavoro di tesi, provengono da un sito archeologico localizzato lungo la costa meridionale del Perù, in cui dal 1982, sta operando il Progetto Nasca (Orefici, 1992). Con l'autorizzazione dell'*Instituto Nacional de Cultura* del Perù, il progetto prevede una ricerca pluriennale e pluridisciplinare con la collaborazione di specialisti in diversi settori della ricerca scientifica.

Grazie a questi studi, è stato possibile ricostruire molti aspetti della cultura Nasca, caratterizzata dalla diffusione dell'inimitabile ceramica policroma, dalla tecnologia tessile e dai giganteschi geoglifici nella Pampa di Nazca. A partire dal 500 a.C., infatti, in seguito allo sfaldamento dell'unità religiosa e, forse, politica imposta dalla civiltà di *Chavìn de Huàntar*, nell'area peruviana, principalmente sulla costa, si affermarono alcune culture a carattere regionale. Queste, formatesi alcuni secoli prima, sono state associate da alcuni studiosi alla formazione di società complesse con tradizioni regionali, di modeste dimensioni, indipendenti l'una dall'altra, ma legate da rapporti commerciali ed accomunate dall'eredità culturale di *Chavìn*. L'esistenza di questi gruppi etnici o "Culture regionali" è documentata a partire dal 700 a.C. circa: alcune ebbero breve durata, altre perdurarono fino al 700 d.C., durante l'intero arco di tempo definito come Periodo Intermedio e Orizzonte Medio. E' in questo contesto temporale che si colloca quella che è stata denominata come "Cultura Nasca", sebbene si conosca ben poco riguardo all'identità delle genti che vissero nelle vallate di Ica e Nazca a partire dal 500 a.C.. Per lungo tempo gli archeologi hanno ritenuto la cultura Paracas distinta da quella Nasca, mentre oggi tendono piuttosto a considerarle un'unica tradizione che si sviluppò senza soluzione di continuità per un considerevole arco di tempo, compreso tra il 500 a.C. ed il 600 d.C.. La società Nasca era altamente specializzata e le principali

risorse economiche su cui si basava erano la pesca e l'agricoltura. Quest'ultima si avvaleva di un complesso ed ingegnoso sistema di irrigazione che consentiva di rendere fertili e produttive aree e vallate in origine aride e desertiche. Nel periodo più antico, quando ancora permaneva un forte legame con la tradizione Paracas, gli artigiani eccelsero nell'arte tessile ma, nel corso del tempo, si affermò sempre più anche la produzione di ceramica, che raggiunse un altissimo livello tecnico. I recipienti dipinti possono essere considerati una sorta di "dizionario illustrato" del pantheon religioso, dal momento che numerosi esseri antropomorfi e mostruosi vi sono raffigurati in maniera ricorrente. Attraverso l'arte fittile, inoltre, emerge l'importanza del culto delle teste-trofeo, legate alla pratica rituale della decapitazione, assai diffusa fin dal primo Orizzonte, ma divenuta una pratica consueta in seno alla Cultura Nasca. Oltre che dalle espressioni artistiche e manifatturiere, la Cultura Nasca è documentata anche attraverso le vestigia architettoniche di alcuni centri di religiosi, tra i quali Cahuachi sembra aver assunto il ruolo di centro egemone tra il 200 a.C. e il 550 d.C. (Orefici 1992). Nonostante sia ritenuto la "capitale" della regione, l'indagine archeologica non ha rilevato strutture tali da farlo considerare un vero e proprio impianto urbanistico, quanto, piuttosto, un "Centro Cerimoniale", tra i più grandi della costa sud peruviana, sede di una potente oligarchia teocratica. La divisione in caste e categorie di lavoro caratterizzò la società naschense, che si sviluppò, pertanto, in un complesso sistema teocratico. La classe dominante conferì una grande importanza all'agricoltura, solido elemento di sopravvivenza, d'intercambio e di permanenza del culto delle divinità legate alle coltivazioni ed alla pesca. I fattori che maggiormente influenzarono lo sviluppo dell'agricoltura nella zona del Rio Grande (bacino idrografico in cui si insediò principalmente il popolo Nasca) furono l'apporto derivante dai corsi d'acqua, per lo più a carattere torrentizio, e la falda di risorgive presente nei fondo valle. Grazie a questi due preziosi elementi, fu possibile contrastare la desertificazione avanzante ed ottenere una produzione sufficiente per consentire lo sviluppo anche delle attività manifatturiere e l'allevamento di animali, principalmente di camelidi. Non è un caso, infatti, che i primi insediamenti urbani e religiosi si svilupparono, pertanto, nelle vicinanze dei corsi d'acqua e nei luoghi relazionati alla presenza di sorgive. Soltanto nell'epoca pre-ispanica, l'adozione di sistemi di captazione idrica (le gallerie filtranti) permisero l'edificazione dei centri urbani anche nelle località intermedie, nell'area compresa tra il Rio Nasca ed il Rio Las Trancas.

Agricoltura ed alimentazione:

Il territorio peruviano è caratterizzato da una molteplice varietà di ecosistemi che hanno fornito alle popolazioni precolombiane una vasta gamma di prodotti destinati sia all'alimentazione sia alle attività manifatturiere. L'area costiera, o *chala*, che si estende dal litorale sino agli 800 metri sul livello del mare è costituita da un ambiente per lo più desertico, con grandi corsi d'acqua che

scendono dalle pendici andine. Questa risorsa idrica ha permesso lo sviluppo di una fiorente agricoltura, pur nella quasi totale assenza di piogge. Più ad oriente, il territorio, roccioso ed arido, è costituito da profonde vallate con una ridotta superficie coltivabile mentre, al contrario, le vallate interandine, caratterizzate da una maggiore umidità e da una temperatura più mite, permettono la crescita di una rigogliosa vegetazione e la coltivazione di un gran numero di piante. Questa notevole varietà di ambienti naturali e di condizioni climatiche che caratterizza il territorio andino ha influenzato profondamente lo sviluppo delle civiltà dell'antico Perù. Fu proprio questa molteplicità di ecosistemi e di risorse naturali che permise lo sviluppo di società complesse in un ambiente "estremo" e difficile come quello andino. Allo stesso tempo, l'intercambio dei prodotti tipici di ogni piano ecologico stimolò i contatti tra le diverse popolazioni, favorendo fenomeni di interazione culturale. Con il progressivo sviluppo dell'agricoltura (affermatasi come principale attività socio-economica a partire dal 1800 a.C. circa) iniziò quella interdipendenza tra le floride popolazioni costiere, stanziate lungo le oasi fluviali, e le popolazioni della sierra nei cui territori erano situate le sorgenti dei fiumi. Tra le prime piante addomesticate in Perù, sull'altopiano andino si annovera la patata (*Solanum tuberosum*), l'olluco (*Ullucus tuberosus*), mentre in territori costieri e più caldi abbiamo il peperoncino (*Capsicum sp.*), il fagiolo (*Phaseolus vulgaris*). Il Perù fu anche un importante centro di dispersione di specie fondamentali come ad esempio: *Arachis hypogaea*, *Canavalia sp.* e *Phaseolus lunatus*, tra le leguminose e la *Manihot esculenta* e la *Ipomoea batatas* tra le tuberiformi, ed il cotone (*Gossypium sp.*) di notevole importanza socio-economica, e tra le cucurbitacee la zucca (*Cucurbita moschata*) e la *Lagenaria siceraria*, importante per la sua trasformazione in utensili da cucina (Piacenza 2001). Le tecniche agricole perfezionate nel corso dei millenni permisero alle popolazioni peruviane di usufruire di una vasta quantità di prodotti agricoli. Tra questi, due assunsero particolare importanza: il mais ed i tuberi. Coltivato sulla costa, nelle valli interandine e sulle pendici orientali della Cordigliera, il mais rappresentò sempre il prodotto agricolo più prestigioso e stimato del mondo andino, come in gran parte nel continente americano. Gli albori della coltivazione del mais in Perù non sono ancora del tutto chiariti. La maggior parte degli studiosi propende per l'ipotesi secondo la quale il mais più antico fu introdotto in Perù, verso il 3000 a.C., dall'area mesoamericana.

L'introduzione del mais segue di poco l'inizio della coltivazione di altre piante locali come i fagioli, coltivati attorno al 3500 a.C., il peperoncino e la zucca. In Perù, i grani di mais venivano consumati tostati e bolliti, spesso come ingredienti di zuppe nelle quali erano mischiati con i fagioli. La tostatura dei grani e dei semi ha due ruoli principali: migliorare la qualità ed il gusto, in quanto i carboidrati sono convertiti in zuccheri, e rendere più facile la masticazione, in seguito al frazionamento della cuticola dei semi. E' plausibile che i principali modi di conservazione, quali la

tostatura e l'essiccazione, non differiscano molto dai procedimenti moderni. Trattandosi di colture complesse, le abitudini alimentari e le tradizioni gastronomiche sono tra le manifestazioni culturali che più si radicano nella consuetudine, specie se le pietanze sono preparate con ingredienti analoghi. L'importanza del mais, alimento basilare nell'alimentazione delle popolazioni del Nuovo Mondo, viene documentata anche da numerosi Cronisti spagnoli. Bernabè Cobo (1981) dichiara che « el pan más común y universal es el maíz ». Anche Garcilaso de la Vega (1977) riferisce del mais come “pan de la tierra”. Il concetto del mais come “pan de la tierra”, fa risaltare come il pane, alimento fondante europeo, avesse un suo corrispettivo presso le popolazioni indigene, anche se non tratto dalla farina del frumento (Gasca, 1998). Dal mais, inoltre, si ricavava la più comune bevanda del mondo andino, la *chicha*, un prodotto alcolico fermentato ottenuto mediante un complesso procedimento. I grani di mais, venivano inumiditi e conservati tra le foglie di achira (*Canna indica*), fino al momento in cui iniziavano a germinare. A questo punto, erano lasciati seccare: una parte veniva macinata, mentre l'altra era masticata così da dare avvio al processo di fermentazione ad opera degli enzimi contenuti nella saliva. Il tutto era lasciato fermentare per alcuni giorni in vasi di terracotta. Dalla durata del processo di fermentazione dipendeva la gradazione alcolica del prodotto finale. Con procedimenti simili si otteneva la *chicha* anche da tuberi ed altri vegetali e, oltre che come bevanda quotidiana, era utilizzata anche durante le libagioni ed i riti religiosi.

Come si è detto, gran parte dei piatti della cucina andina erano costituiti da zuppe; oltre al mais ed ai tuberi, tali zuppe erano preparate anche con altri ingredienti come i legumi e gli pseudo-cereali, tra cui l'amaranto (*Amaranthus sp.*) e la quinoa (*Chenopodium quinoa*). Quest'ultima, con cui si produceva anche la *chicha*, costituì una delle coltivazioni quantitativamente più rilevanti delle aree alto-andine durante il periodo preincaico fino al periodo coloniale. Ai giorni nostri la quinoa è oggetto di esportazione nei mercati europei. Diversi tipi di legumi erano coltivati tanto sulla costa quanto nelle zone montuose (*Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus lunatus*, *Canavalia ensiformis*) (Fig. 3). Uniti al peperoncino, alla patata, alla manioca ed alla zucca, costituivano gli alimenti di base delle antiche colture peruviane e, insieme ai prodotti della pesca, della caccia e dell'allevamento, permisero ai peruviani di fondare la loro sopravvivenza su una dieta complessa e variata.



Fig. 3: diversità varietale del *Phaseolus lunatus*.

Alimenti e religione:

Le piante alimentari dell'antico Perù ebbero un ruolo basilare nell'ambito dell'ideologia religiosa e della ritualità andina. Su gran parte delle ceramiche cerimoniali delle culture preincaiche l'iconografia fitomorfa riproduce piante legate all'alimentazione. L'importanza rituale di alcuni prodotti agricoli è testimoniata, inoltre, dal fatto che tra le "linee di Nasca", i grandi disegni tracciati sulla superficie desertica della pampa, compaiono raffigurazioni di piante e tuberi (Fig. 4) accanto a quelle delle principali divinità ornitomorfe.



Fig.4: antiche rappresentazione di tuberi.

Le ceramiche delle Culture Paracas, Nasca, Moche e Chimù ci offrono una vasta gamma di rappresentazioni di piante, frutti e semi. In epoca incaica, il mais assunse un ruolo primario nell'ambito religioso. Nel tempio del sole di Cuzco, la Coricancha, vi erano riprodotte in oro le principali piante alimentari tra le quali primeggiava la pianta del mais, coltivato anche per usi religiosi e rituali ed il raccolto era conservato in recipienti d'argento. La regione circostante alla capitale Cuzco, era indubbiamente una delle più produttive del mais e fu durante l'impero incaico che la coltivazione di questo cereale fu istituzionalizzata ed associata allo Stato ed al culto ufficiale, ed i rituali della semina e del raccolto assunsero un'importanza particolare, in quanto l'Inca in persona ne iniziava le attività.

Anche la iconografia fitomorfa delle ceramiche preincaiche suggeriscono come spesso alle piante fossero associati significati che vanno ben al di là della loro funzione alimentare e la maggior parte dei culti ad esse connessi, infatti, fa riferimento alla fertilità della terra ed alla sua importanza per la sussistenza dell'uomo. A questo proposito, il caso forse più interessante è quello del fagiolo. Sulle ceramiche della Cultura Moche, della costa settentrionale, si osserva una notevole quantità di

rappresentazioni di fagioli: fagioli-guerrieri, fagioli-signori, fagioli-corridori e fagioli-animali. Un gran numero di immagini, inoltre, raffigura fagioli decorati con segni diversi, possibile codice di comunicazione.

Altrettanto importante è la presenza dei fagioli nell'iconografia religiosa paracas-nasca, dove spesso questi legumi sono associati alle immagini delle divinità. In questo contesto culturale, infatti, l'iconografia dei fagioli è spesso sostituibile e, quindi, in qualche modo equivalente, a quella delle teste-trofeo. (teste, cioè, tagliate e conservate che le divinità paracas-nasca ostentano nelle loro rappresentazioni). Tale associazione ha spinto gli studiosi ad ipotizzare un legame tra i fagioli ed il concetto di morte / rigenerazione a cui si collega, probabilmente, la pratica di conservazione delle teste-trofeo. A rafforzare questa teoria, un ritrovamento nella necropoli di Wari Kayan, nella penisola di Paracas, ha messo in evidenza come uno dei fardi funerari non contenesse il corpo del defunto, ma ben dodici chili di fagioli neri. Nonostante all'esterno presentasse tutti gli elementi comuni ai normali fardi funerari, questo particolare ritrovamento fu interpretato come la sepoltura di un guerriero ignoto morto lontano. Indipendentemente da ogni interpretazione, la presenza di fagioli nel fardo sembra confermare un loro legame con i concetti di morte e rigenerazione.

Nella costa sud del Perù, dove si manifestarono, tra le altre, la Cultura Nasca, quasi sull'attuale confine con il Chile, si insediò la Cultura Chiribaya, (900-1100 d.C.). Gli scavi effettuati dalle investigazioni archeologiche dirette dalla Dott. Sonia Guillèn del Centro Mallqui, in Algarrobal (Ilo) ha permesso il recupero di molti resti botanici, la cui identificazione conferma sia il loro consumo in tempi preincaici sia la loro appartenenza alle specie botaniche citate dai cronisti spagnoli. Offrire alimenti ai defunti era tradizione comune a diversi gruppi etnici andini e, nel corso degli scavi archeologici ad Ilo, nella vallata del fiume Osmore, fra le altre offerte fu ritrovata una ciotola il cui contenuto (Fig. 5; Fig. 6) nel suo insieme, appariva come una zuppa di fagioli.



Fig. 5: ritrovamento di offerte votive nel corso degli scavi archeologici ad Ilo, nella vallata del fiume Osmore.



Fig. 6: scavi archeologici nella località di Cahuachi Sud del Perù. Scavi sepolcrali.

Un'analisi più attenta ha rilevato che si trattava di una miscela di fagioli e mais, molto simile ad una zuppa *mapuche* denominata “Pilco”. Questa evidenza alimentare, pertanto, propone relazioni culturali tra le popolazioni locali con le altre che vivevano più a Sud, lungo la costa. Sono state rinvenute, inoltre, tra le offerte, borse di tela contenenti una grossolana farina di mais o scodelle contenenti impasti della farina di mais avvolti nei cartocci della pannocchia e cotti al vapore, genericamente conosciuti con il termine messicano di *tamales* o *humintas* in quechua (Fig. 7) (Piacenza 2005; Piacenza 2004).



Fig.7: ritrovamento, nel corso degli scavi archeologici ad Ilo, di ciotole contenenti alimenti simili alle odierne *tamales* o *humintas*

Questi preparati alimentari appartengono alla più antica tradizione gastronomica e potevano essere addizionati a differenti ingredienti: carne, peperoncino o miele. In quasi tutti i contesti tombali delle sepolture della vallata di Osmore sono stati ritrovati recipienti contenenti i resti delle vivande offerte al defunto e future analisi di laboratorio potranno chiarire quali sostanze compongono i cibi e favorire, inoltre, la ricerca sul valore della dieta alimentare dei gruppi etnici locali che, stando agli studi di osteologia effettuata sui resti umani, manifestavano segni di anemia, dovuti a probabili carenze alimentari.

Ma la pianta che, sebbene il suo uso non fosse prettamente alimentare, racchiuse in sé il più importante significato rituale del Perù precolombiano, fu sicuramente la coca (*Erythroxylum coca*). Le evidenze archeologiche dell'utilizzazione di questo vegetale risalgono alle fasi più arcaiche delle culture peruviane. Tale era l'importanza, il valore economico e rituale della coca che i migliori terreni degli Incas e dello Stato dovevano essere dedicati alla sua coltivazione. Ancora oggi il consumo di coca è molto diffuso e le sue foglie possono essere masticate per lungo tempo, in modo da ottenere un effetto energizzante, o preparate appositamente per preparare una sorta di tè, il *mate* di coca, molto utile per combattere il malessere dell'altopiano.

Gli esempi riportati, lasciano intravedere la complessità dei significati ideologici connessi alle piante alimentari del Perù precolombiano. Le pannocchie d'oro di Cuzco, i fagioli-guerrieri mochica ed i vegetali raffigurati nei grandi disegni del deserto di Nasca non sono che alcuni degli aspetti più appariscenti ed affascinanti, rappresentativi di un complesso universo umano e soprannaturale. In futuro, in base agli attuali dati archeologici, antropologici e botanici, la comparazione con nuovi risultati di laboratorio potrà mettere a punto e definire meglio tecniche di ricerca su importanti problemi circa l'alimentazione e lo sviluppo fisico delle popolazioni andine.

Scopo della Tesi:

Il presente lavoro di tesi ha riguardato l'analisi delle proteine di riserva in alimenti antichi (farine) e semi, sia antichi che moderni, provenienti da scavi archeologici localizzati nella regione meridionale del Perù, più precisamente nelle località di Cahuachi ed Ilo. Lo studio, in collaborazione con il progetto Nasca, ha preso in esame 3 campioni di farine antiche, ritrovate come offerte votive in scavi sepolcrali, e semi antichi appartenenti a *Phaseolus* spp. e *Zea mais*.

Di contro, sono stati analizzati i corrispettivi semi attuali appartenenti a *Phaseolus lunatus*, corrispondenti alle tre varietà Centro- e Sud- Americane più rappresentative (Big Lima, Sieva e Potato), a *Phaseolus vulgaris*, inerenti i due pool genici principali (Mesoamericano ed Andino), e, infine, ad una varietà peruviana di *Zea mais*, nota con il termine commerciale di Giallo Morado.

Trattandosi di uno studio preliminare, lo scopo principale è stato quello di verificare il grado di conservazione proteica per ciascun tipo di campione (seme o farina) e mettere a punto protocolli idonei per l'estrazione, la purificazione e l'analisi elettroforetica di ciascuna accessione.

Lo studio delle proteine di riserva, sia nei campioni antichi che moderni, è stata effettuato mediante tecniche elettroforetiche (SDS-PAGE) che hanno permesso di confrontare i rispettivi *patterns* proteici, grazie anche all'ausilio della densitometria diretta. In aggiunta, sono state effettuate tecniche cromatografiche allo scopo di ottenere una migliore purificazione del campione, problema particolarmente sentito per l'analisi del materiale antico, in cui, molto spesso, la purezza dell'estratto proteico risultava molto scarsa, indice di un'eccessiva degradazione del campione.

In secondo luogo, si è cercato di stabilire, sulla base delle sequenze più rappresentative, o meglio conservate, (faseoline nei semi antichi di *Phaseolus* spp. o zeine nel caso di *Zea mais*) le relazioni evolutive tra i campioni esaminati per verificare se dette sequenze potessero rivelarsi degli utili marcatori biochimici.

Per quanto concerne le farine, invece, si è cercato di accertarne la composizione alimentare, sulla base anche delle precedenti evidenze archeologiche.

I risultati ottenuti, nel complesso soddisfacenti, dovranno essere riconfermati da ulteriori analisi quali *immuno-blotting* o identificazione delle componenti proteiche mediante spettrometria di massa.

Materiali e metodi

Il materiale vegetale utilizzato nel presente lavoro di tesi comprende semi antichi e moderni di *Zea mays* e *Phaseolus* spp., in particolar modo le specie *vulgaris* e *lunatus*.. Sono state prese in considerazione, inoltre, alimenti antichi (farine) rinvenute come offerte votive nel corso degli scavi archeologici nelle località di Cahuachi ed Ilo, situate lungo la costa meridionale del Perù.

Il materiale vegetale antico è stato gentilmente fornito dal Dr. Luigi Piacenza, collaboratore al progetto Nasca.

La tabella sottostante riassume il materiale vegetale utilizzato nel presente lavoro, la provenienza e, dove nota, la datazione di ogni reperto archeologico:

Materiale	Classificazione	Provenienza	Datazione	N° di semi
Phaseolus spp. Antichi	PLA 1: <i>Ph. lunatus</i> tigrato	Ilo-Total	900 d.C.	1
	PLA 2: <i>Ph. Sp. (Ph. Lunatus?)</i> , 2001	Ilo-Total	900 a.C.	5
	PLA 3: <i>Ph. lunatus</i> , 1997	Cahuachi	200a.C.- 400 d.C.	2
	PLA 4: <i>Ph. lunatus</i> var. <i>papasieva</i> , (91 Y13-49)	Cahuachi	200a.C.- 400 d.C.	5
	PLA 7: <i>Ph. Lunatus</i> var. <i>sieva</i> , 2001	Ilo		Semi e baccello
	PVA 5: <i>Ph. Vulgaris</i> CAH 87	Cahuachi	200-400 a.C.	9
	PVA 6: <i>Ph. Vulgaris</i> 018	Ilo-Total		1
Phaseolus spp. Moderni	PLM 1: <i>Ph. Lunatus</i> Potato P1051	coll. Privata	Attuale	2
	PLM 2: <i>Ph. Lunatus</i> Big Lima IPK-PHA8078	Banca dati tedesca	Attuale	2
	PLM 3: <i>Ph. lunatus</i> Sieva 18K-PHA8111	Banca dati tedesca	Attuale	2
	PVM 4: <i>Ph. vulgaris</i>		Attuale	
	PVM 5: <i>Ph. vulgaris</i>		Attuale	
Mais Antichi	MA 1: Mais 018	Ilo-Total		12
	MA 2: Mais Cahuachi	Cahuachi		12
	MA 3: Mais Cahuachi	Cahuachi	200 a.C.-500 d.C	10
	MA 4: Mais Ilo (1000) cotto?	Ilo		5
	MA 5: Mais Ilo cotto?	Ilo		3
Mais moderno	MM 1: Mais Giallo Morado	Cuzco	Attuale	5
Farine Antiche	LP1	Chiribaya/Yaral	900-950 d.C.	-
	LP2			-
	LP3			-

Tab. 6: Materiale vegetale utilizzato nel presente lavoro di tesi.

Più nel dettaglio, il lavoro ha riguardato l'analisi delle proteine di riserva ed il loro grado di conservazione in 7 campioni antichi di *Phaseolus* spp., più precisamente 2 appartenenti quasi sicuramente a *P. vulgaris*, ed i restanti 5 a *P. lunatus*, anche se, in alcuni casi, la classificazione è incerta. Sono stati presi in considerazione, inoltre, 5 semi di mais antichi, alcuni dei quali probabilmente cotti ed utilizzati in epoca precolombiana come alimento. Di contro, sono state analizzate 2 varietà moderne di *Phaseolus vulgaris*, corrispondenti ai principali *patterns*, Mesoamericano ed Andino, e 3 varietà di *P. lunatus*, provenienti da banche dati o collezioni private (nella tabella sovrastante sono riportati i rispettivi numeri di accessione) e corrispondenti alle cultivar Big Lima, Sieva e Potato. Per il confronto con *Zea mais*, si è scelta una varietà di origine peruviana, il cui *pattern* proteico è stato relazionato con quello dei rispettivi semi antichi.

Di seguito è riportato il materiale fotografico relativo ai semi antichi e moderni:



Figura 8: nell'ordine (dall'alto verso il basso e da sinistra a destra): *Phaseolu lunatus*, **PLA 1**, **PLA 2**, **PLA3** (2 esempi riportati), **PLA4** (2 esempi riportati), **PLA 7** (seme e baccello), *Phaseolus vulgaris*, **PVA6** e **PVA 5**.

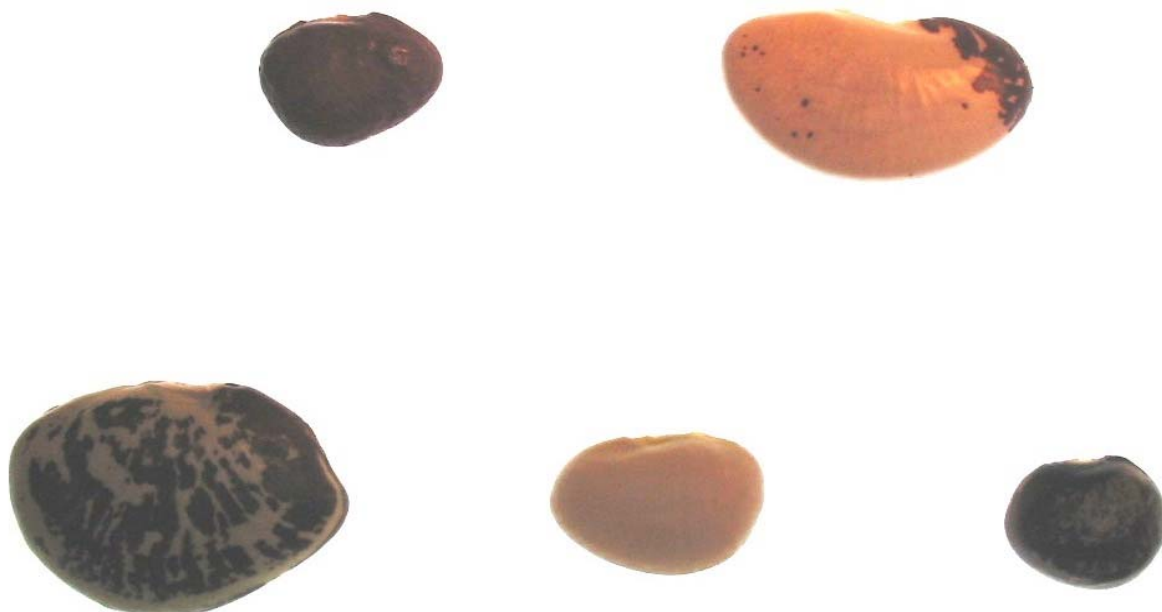


Figura 9: nell'ordine (dall'alto verso il basso e da sinistra a destra): *Phaseolus vulgaris*, **PVM5** e **PVM4**; *Phaseolus Lunatus*, **PLM2**, **PLM3**, **PLM1**.



Fig. 10 : semi di *Zea mays* utilizzati nel presente lavoro. Nell'ordine, da sinistra a destra: **MM1:** Zea mais moderno; **MA1:** mais antico, Ilo; **MA2:** mais antico, Cahuachi; **MA3:** mais antico, Cahuachi; **MA4:** mais antico, Ilo; **MA5:** mais antico, Ilo.

Per quanto concerne, invece, l'analisi delle farine, sono stati analizzati 3 differenti campioni, provenienti da urne votive e probabilmente utilizzati come alimento in epoca precolombiana.

Di seguito è riportato il materiale fotografico relativo alle farine:



Fig. 11: da sinistra a destra: **LP1, LP2, LP3.**

*Estrazione delle proteine totali da semi antichi e moderni di *Phaseolus spp.* e da alimenti antichi:*

Primo metodo:

Prima di essere macinati, i semi sono stati lavati in una soluzione di acqua e ipoclorito di sodio, per pulirli da eventuali patogeni od altri inquinanti. A lavaggio ultimato, sono stati scarificati, per asportare i tegumenti superficiali, e polverizzati in un mortaio. La farina ottenuta si è trasferita in *eppendorf*, dove è stata omogeneizzata, con l'ausilio di un mortaio a mano, insieme al tampone di estrazione. Al contrario dei semi moderni, i campioni antichi si scarificano molto facilmente ma presentano una maggiore resistenza all'omogenizzazione, dovuta, forse, alla mummificazione dei tessuti. Dopo l'aggiunta del tampone di estrazione, inoltre, il materiale antico tende ad assumere colorazioni molto particolari, dal giallo tenue, al marrone intenso. Prima di procedere all'estrazione, il materiale di partenza viene pesato (si sono prelevati all'incirca 100 mg dagli alimenti antichi e 200 mg dai cotiledoni dei semi, antichi e moderni) ed addizionato al tampone di estrazione, in volumi variabili a seconda dei mg prelevati (generalmente 100 μ l ogni 100 mg di campione) ed in misura tale da ottenere un omogeato non eccessivamente liquido.

Il tampone di estrazione (per un volume finale di 8 ml) è stato preparato nel modo seguente:

Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	1 ml
SDS 10% (p/v)	1,6 ml
H ₂ O distillata	5 ml
2-Mercaptoetanol	400 µl

Si è lasciato agire il tampone di estrazione per circa 20', omogeneando, di tanto in tanto, con il mortaio a mano. I campioni, poi, sono stati fatti bollire per 3 minuti, omogeneizzati ulteriormente e lasciati bollire per altri 3 minuti. L'omogeneato ottenuto, poi, si è centrifugato per 20' in microcentrifuga da tavolo a 13.000 g. A questo punto, si recupera il sovrantante e se non è ben limpido si ricentrifuga la soluzione per 10' alle condizioni sopradescritte.

Secondo metodo:

Per l'estrazione delle proteine di riserva di *Phaseolus*, a partire da semi (antichi e moderni) e da alimenti antichi, si è testato anche un secondo metodo di estrazione che prevede l'utilizzo del tampone sodio borato. Anche in questo caso, i semi sono stati lavati e scarificati e, con l'ausilio di un bisturi, si sono prelevati circa 200 mg di porzione cotiledonare, successivamente pestata in mortaio fino ad ottenerne una farina. Nel caso degli alimenti antichi, al contrario, si sono pesati 100-150 mg di farina, e, a seconda della granulometria del materiale di partenza, si è proceduto ad omogeneizzazione in mortaio. In entrambi i casi, la farina ottenuta è stata trasferita in *eppendorf* ed addizionata al tampone di estrazione Na-borato 50 mM, pH 9, secondo un volume di 1:4.

Per preparare il tampone Na-Borato 50 mM pH 9 occorrono:

50 ml di soluzione 0,1 M contenente:

H ₃ BO ₃ (0,1 M):	62,2 gr
KCl (0,1 M):	7,46 gr

Si porta a pH 9 con NaOH 0,1 M e si aggiusta il volume fino ad una concentrazione finale di 0,05M. A questo punto si aggiunge il 10% (v/v) di NaCl.

Il tampone di estrazione viene lasciato agire per circa 20-30 minuti e durante questa fase i campioni sono mantenuti in ghiaccio. Successivamente, si procede a centrifugazione dei campioni, per 15 minuti, a 13000 rpm ed in condizioni refrigerate. A centrifuga avvenuta, si recupera il surnatante e si procede alla dialisi dell'estratto proteico in 3 litri di Tris HCl pH 6,8, alla concentrazione finale di 62,5 mM, per 3 ore, con un cambio dopo circa un'ora.

Estrazione delle proteine da semi di mais (*Zea mays*), antichi e moderni, e da alimenti antichi

Dopo un rapido passaggio in ipoclorito di sodio e acqua, i semi interi vengono scarificati con l'ausilio di un bisturi e macinati in un mortaio fino all'ottenimento di una farina che sarà, successivamente trasferita in *eppendorf* ed addizionata al tampone di estrazione

Nel caso dell'estrazione da alimenti antichi, si prelevano all'incirca 100 mg di farina che vengono comunque ulteriormente frantumati in un mortaio e successivamente trasferiti in *eppendorf* dove saranno addizionati al tampone di estrazione, esattamente come per i semi antichi e moderni.

Tamponi di estrazione differenti sono stati usati per frazionare le componenti proteiche, in modo da estrarre, nell'ordine, le gluteline e le proteine solubili in sali, le prolamine, solubili in alcool, e, infine, le gluteline alcol insolubili. I volumi dei differenti tamponi di estrazione sono stati valutati di volta in volta, sulla base della quantità del materiale di partenza (generalmente 400µl ogni 100 mg di campione) e del *pellett* di volta in volta ottenuto, in modo da sospenderlo completamente senza arrivare ad una eccessiva solubilizzazione. Ogni operazione, inoltre, viene eseguita due volte.

Le farine ottenute, pertanto, vengono trattate con il primo tampone di estrazione (*T.E. 1*) (Concentrazioni finali: tampone NaP (pH 7,0) 0,1 M ; NaCl 0,4 M).

Per preparare 100 ml di Tampone NaP 0,1 M , pH 7, occorrono:

Na₂HPO₄ (1 M): 5,77 ml

NaH₂PO₄ (1 M): 4,23 ml

La soluzione così ottenuta viene portata al giusto valore di pH e, successivamente, al volume finale di 100 ml.

Per 10 ml di **T.E. 1** occorrono:

Tampone Na-P 1M, pH 7,0	1 ml
NaCl 1M	4 ml
H ₂ O distillata	5ml

Dopo aver lasciato agire il tampone per circa 20' i campioni vengono centrifugati, in condizioni refrigerate (4 °C), a 14000 g per 20' e si recupera il sovrnatante. A questo punto la soluzione contenente le proteine viene messa a dializzare per tre ore contro acqua distillata (4 litri), con un cambio dopo circa un ora. Si ottiene così la frazione SN2, le gluteline e le proteine solubili in sali. Il *pellet* ottenuto della precedente estrazione viene risospeso con il secondo tampone di estrazione, **T.E. 2**, (Concentrazioni finali:etanolo 70%; 2-Mercaptoetanolo 0,01 M).

Per preparare 10 ml di T.E. 2 occorrono:

Etanolo assoluto	7 ml
2-Mercaptoetanolo	100 µl
H ₂ O distillata	3 ml

Il tampone viene lasciato agire per circa 20-30 minuti, agitando, di tanto in tanto, l'omogenato al fine di favorire l'estrazione delle prolamine. In tutti questi passaggi, il campione viene sempre tenuto in ghiaccio e, dopo il tempo indicato, si procede a centrifugazione nelle condizioni sopra indicate. Anche in questo caso, si recupera il surnatante, la frazione prolamina, **SN4**, (le zeine nel caso del mais), che, contrariamente alla SN2, non viene dializzata.

Il "pellet" della estrazione precedente, viene risospeso con il terzo tampone di estrazione, **T.E. 3**, (Concentrazioni finali: SDS 2,5%; NaCl 0,01M; Tampone NaP (pH7) 0,1M).

Per 10 ml di T.E. 3 occorrono:

Tampone Na-P 1M pH 7,0	1 ml
SDS 10% (p/v)	2,5 ml
NaCl 1M	100 μ l
H ₂ O distillata	6,4 ml

Si procede come nelle fasi precedenti. A centrifuga avvenuta, si recupera il surnatante che, in questo caso, viene messo a dializzare contro acqua, nelle stesse condizioni della frazione SN2.

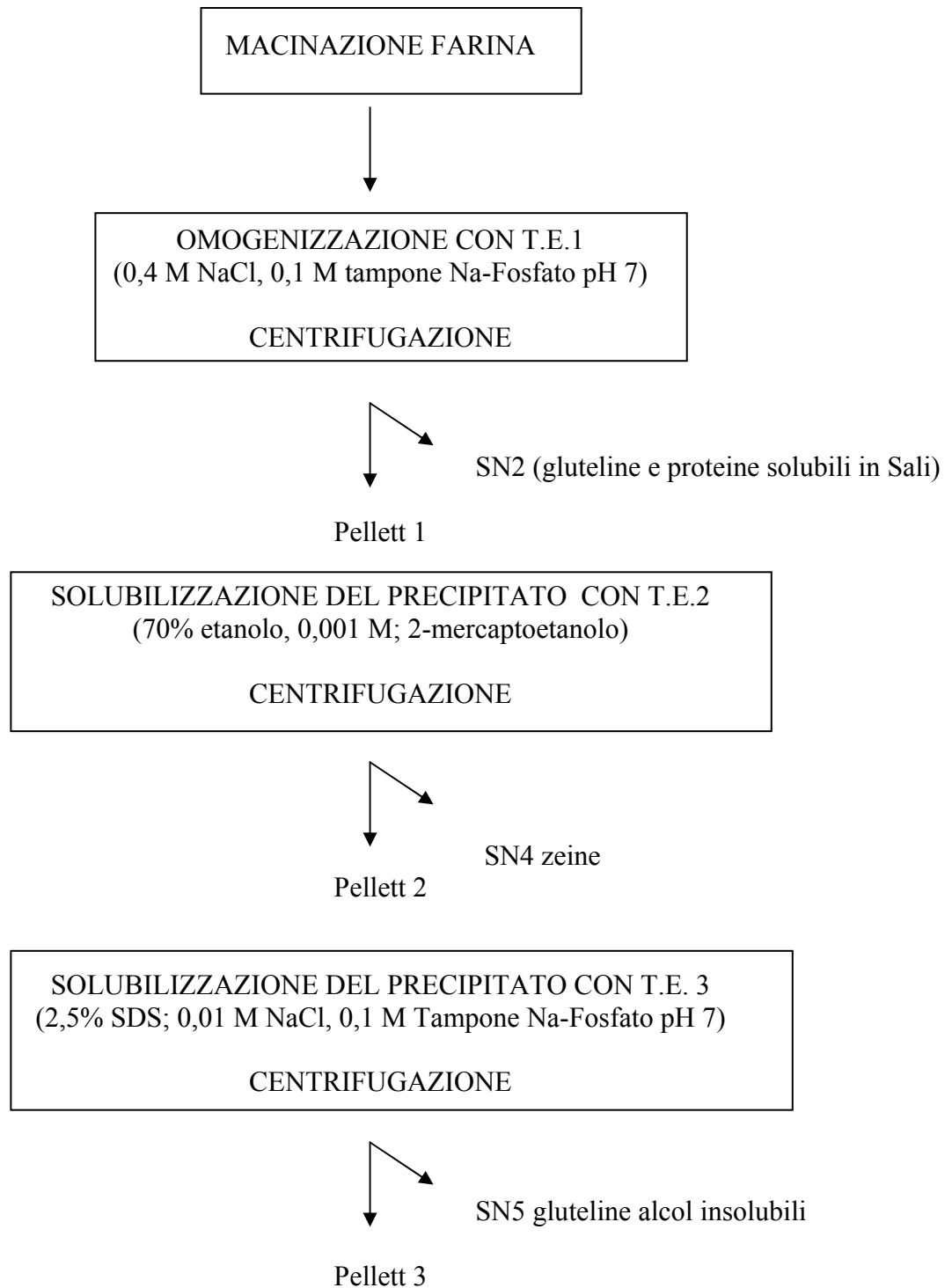
Si è così estratta anche l'ultima frazione (**SN5**), rappresentante le gluteline alcol insolubili.

Tutte le proteine estratte, prima di essere caricate sul gel, devono essere quantizzate, frazionate e liofilizzate.

Rappresentazione schematica dell'estrazione delle proteine di riserva in mais:

Ciascun passaggio viene ripetuto 2 volte

Centrifuga: 14000 g per 20' in condizioni refrigerate



Quantizzazione delle proteine:

La determinazione del contenuto proteico viene fatta con il *Bio-Rad Protein Assay Kit II.*

Vengono preparati:

2 repliche per il "bianco" (0,2 ml di reagente; 0,8 ml di H₂O)

2 repliche per lo "standard" (10 µl di standard; 0,2 ml di reagente; 0,79 ml di H₂O)

2 repliche per il "campione" (x µl di campione; 0,2 ml di reagente; 0,79 ml di H₂O).

Si agita energicamente e si lascia avvenire la reazione per 15' a temperatura ambiente; quindi si eseguono le letture spettrofotometriche a 595 nm, azzerando contro il "bianco".

La concentrazione, in µg/µl, dei campioni si ottiene dal raffronto con lo "standard" (BSA) a concentrazione nota (1,35 mg/ml) secondo la seguente proporzione:

$$\mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{1,35 : \text{Abs } 595_{\text{standard}} = \text{Abs } 595_{\text{campione}} : X}{\mu\text{l del campione letti}}$$

Precipitazione delle proteine con acetone:

Al fine di concentrare e purificare gli estratti proteici, problema che si è posto principalmente per i campioni antichi, sia semi che alimenti, si è preceduto alla precipitazione con acetone mediante il seguente protocollo.

L'estratto proteico, tutto o in parte, è stato addizionato a 4 volumi di acetone assoluto e le proteine sono state lasciate precipitare, per un'ora, a -20 °C. Si procede, poi, a centrifuga per 20 minuti a 10000 rpm ed in condizioni refrigerate (4 °C), al termine dei quali, si scarta il surnatante ed il *pellet* viene nuovamente sospeso in acetone all'80%. I volumi, in questo caso, sono variabili ed in relazione alla quantità di *pellett* ottenuta. Il lavaggio viene lasciato procedere per circa 20-30 minuti, al termine dei quali si procede nuovamente a centrifuga nelle condizioni sopra descritte. Anche in questo caso si scarta il surnatante ed il *pellett* viene liofilizzato, per circa 5 minuti, (ma i tempi possono essere variabili sulla base della quantità di *pellett* ottenuta) al fine di eliminare ogni residuo di acetone. Le proteine, poi, sono sospese direttamente in 50 µl di tampone di caricamento (Laemmli buffer, veder più avanti per la composizione) e fatte bollire per 5 minuti.

Elettroforesi su gel di poliacrilamide in condizioni denaturanti

(SDS-PAGE secondo Laemmli, 1970)

L'apparecchio elettroforetico usato per il minigel è il Mini-PROTEAN[®] II.

Viene dapprima preparato il *separating gel* (Concentrazioni finali: 12% poliacrilamide; 0,375 M Tris-HCl pH 8,8).

Per preparare 20 ml di gel occorrono:

Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	5 ml
Soluzione Acril./Bis (40%)	6 ml
H ₂ O distillata	8,8 ml

Si degassa e si aggiungono:

SDS 10% (p/v)	0,2 ml
Temed	20 µl
Ammonio persolfato al 10% (p/v)	120 µl

Per evitare la formazione di bolle, il gel viene versato lentamente tra i due vetri dell'apparato elettroforetico verticale. Un velo d'acqua viene stratificato sopra al *separating gel*, al fine di livellare il fronte di corsa. Si lascia polimerizzare per circa 20-30 minuti. Generalmente si sono utilizzati *spacers* da 1,5 mm per i semi moderni e 0,75 mm per i campioni antichi.

A questo punto, si prepara lo *stacking gel* (Concentrazioni finali: 4% acrilamide; 0,125 M Tris-HCl pH 6,8).

Per preparare 10 ml di *stating gel* di gel occorrono:

Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	2,5 ml
Soluzione Acril./Bis (40%)	1 ml
H ₂ O distillata	6,4 ml

Si degassa e si aggiungono:

SDS 10% (p/v)	100 μ l
Temed	10 μ l
Ammonio persolfato al 10% (p/v)	60 μ l

Una volta che il *separating* gel è solidificato, lo strato d'acqua superficiale viene tolto e lo *stacking* gel può essere versato. Anche in questo caso occorre procedere molto lentamente per evitare la formazione di bolle. Un pettine da 10 tasche viene posto tra i due vetri ed il gel è lasciato polimerizzare per circa 20-25 minuti.

Prima di essere caricati, i campioni sono stati diluiti nel *sample buffer* e fatti bollire per 5 minuti. Nel caso in cui si utilizzino campioni liofilizzati la diluizione con il tampone di caricamento è 1:1 (p/v). Per preparare circa 8 ml di *sample buffer* (Laemmli) occorrono:

Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	1 ml
H ₂ O distillata	4 ml
Glicerolo	0,8 ml
SDS 10% (p/v)	1,6 ml
2-mercaptoetanololo	0,4 ml

A questo punto, viene aggiunta una punta di bromofenolo, che funge da indicatore di corsa.

Per prepararne, invece, 350 ml di tampone di corsa occorrono:

H ₂ O distillata	350 ml
Glicina	5,04 g
SDS	0,35 g
Tris	1,05 g

La corsa viene condotta a temperatura ambiente ad un voltaggio costante di circa 80 V, fino a che l'indicatore di corsa non ha raggiunto il *separating gel*, poi viene aumentato a 100 V. Il tempo totale di corsa è circa 80 minuti.

Colorazione e decolorazione del gel

Dopo elettroforesi, il gel è stato colorato con Coomassie Blue R (0,2% Coomassie Blue R; 50% Metanolo; 7% Acido Acetico), per 30', in agitazione lenta. Successivamente viene messo a decolorare, con diversi cambi di decolorante, per un tempo variabile (20% Isopropanolo; 7,5% Ac. Acetico).

Un altro metodo di colorazione utilizzato, soprattutto per rilevare i *patterns* dei semi antichi, è stato eseguito con il *Kit Silver Stain* della *Bio-Rad*, seguendo il protocollo modificato per i minigel.

Dopo colorazione, alcuni gel sono stati fotografati e sottoposti a densitometria diretta. I tracciati densitometrici sono stati eseguiti con densitometro *Vernon* e l'indice di similarità è stato calcolato sulla base di Nei e Li (1979) sulla base della seguente formula:

$$\% \text{ di similarità: } \frac{\text{n}^\circ \text{ di bande in comune}}{\text{n}^\circ \text{ di bande differenti} + \text{n}^\circ \text{ di bande in comune}}$$

Tecniche Cromatografiche:

Per alcuni campioni antichi si è reso necessario l'utilizzo di una cromatografia, al fine di purificare ulteriormente l'estratto proteico ed ottenere una migliore visualizzazione dei gel.

In questo caso, si è proceduto ad una cromatografia ad esclusione, utilizzando la resina Sephadex G50 Medium ed una colonna di 10 cm di lunghezza e 2 cm di diametro.

Come concentrazione iniziale dei campioni sottoposti a cromatografia si sono prelevati 50 ng o 100 ng di estratto proteico, portati ad un volume finale di 200 µl. La colonna, inoltre, è stata dapprima equilibrata con Tris HCl 0,5 M pH 7,5 ed il flusso della fase mobile è stato impostato a 40 gocce al minuto. Le frazioni raccolte sono state lette allo spettrofotometro, alla lunghezza d'onda di 280 nm e, successivamente, precipitate con acetone e visualizzate su gel.

Estrazione del DNA con il metodo CTAB (Doyle e Doyle, 1987)

Il metodo CTAB è stato usato per l'estrazione del DNA dai semi antichi e moderni di *Phaseolus lunatus*, *P. vulgaris* e *Zea Mais*.

Protocollo di estrazione:

Circa 200 mg di campione sono stati prelevati da ciascun seme, opportunamente lavato e scarificato, e successivamente frantumati in un mortaio sterile, con l'aggiunta di piccole dosi di polvere di quarzo per aumentare la forza di attrito.

Una volta ottenuta la farina, il campione è stato trasferito in *epENDORF* e addizionato a volumi variabili di tampone di estrazione, generalmente in proporzione 1:4 rispetto al peso della farina.

Per preparare 50 ml di tampone di Estrazione CTAB occorrono:

NaCl 5M: 14 ml

EDTA 0,5M: 2 ml

Tris-HCl 1M pH 8: 5 ml

CTAB 3%: 1,5 g

β -mercaptoetanol 0,2% v/v (da aggiungere solo al momento dell'utilizzo)

H₂O fino al volume finale

Si omogeneizza ulteriormente il campione in *epENDORF* mediante mortaio a mano e, successivamente, il tutto viene trasferito a 60 °C per 20 minuti, agitando di tanto in tanto.

A questo punto, si aggiunga un'uguale quantità di cloroformio-alcol isoamilico (24:1), (precedentemente saturato con Tris-Hcl 100mM, pH 8.0), si agita e si centrifuga a 9000 rpm per 15 minuti alla temperatura di 4° C (rotore: A8.24 *Kontron*).

A centrifuga ultimata, si preleva il surnatante, lo si trasferisce in una provetta sterile e si aggiungono, nell'ordine, 2 μ l /ml di glicogeno e 2/3 del volume totale di isopropanolo freddo.

Si agita dolcemente per qualche istante. La precipitazione del DNA avviene istantaneamente ma è visibile ad occhio nudo solo nei campioni moderni.

Per recuperare il DNA, si procede ad un ulteriore centrifuga, a 3000 rpm per 5 minuti ed alla temperatura di 4 °C (rotore: A8.24 *Kontron*). Successivamente, si scarta il surnatante ed il pellett viene sospeso e lavato con circa 1 ml di Etanolo al 70%. A questo punto, si procede nuovamente a centrifugazione, nelle stesse condizioni sopra esposte, ed il pellett ottenuto viene lasciato asciugare dall'etanolo e successivamente risospeso in un volume adeguato di acqua sterile e lasciato solubilizzare alla temperatura di 4 °C.

In alternativa, qualora si proceda con il trattamento mediante RNasi, il *pellett* viene risospeso in Tris-HCl 100 mM, pH 7.5.

Trattamento con RNasi:

Una volta solubilizzato, il DNA estratto viene trattato con 1000 µl /ml di RNasi (soluzione stock: 10 mg/ml in Tris-HCl pH 7.5, NaCl 1.5 mM) ed incubato per 2 ore alla temperatura di 37 °C.

A questo punto, viene aggiunta un'uguale quantità di cloroformio-alcol isoamilico (24:1), si agita dolcemente il campione e si centrifuga a 9000 rpm per 15 minuti alla temperatura di 4 °C (rotore: A8.24 *Kontron*). A centrifuga ultimata, si preleva il surnatante, lo si trasferisce in una provetta sterile e si aggiungono 1/10 del volume di NaCl saturo e 2 volumi di etanolo assoluto freddo.

Il tutto viene lasciato precipitare alla temperatura di -80 °C per almeno 30 minuti o a -20 °C per 2-3 ore. Successivamente, si centrifuga (rotore: A8.24 *Kontron*) il campione a 9000 rpm, alla temperatura di 4 °C, per 10 minuti al termine dei quali si scarta il surnatante e si lascia solubilizzare il *pellett* in un volume adeguato di acqua sterile alla temperatura di 4 °C.

Il metodo di estrazione:

Il Kit Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal è stato utilizzato per l'estrazione del DNA da una delle farine antiche e dai semi moderni di *P. vulgaris*.

Protocollo di estrazione:

Tutti i reagenti sono già forniti del *Kit*. Occorre assicurarsi, tuttavia, che siano a temperatura ambiente al momento dell'utilizzo e che il "Buffer di lisi" si presenti come una soluzione omogenea. Se questo non accade, agitare gentilmente la soluzione o scaldarla leggermente, in modo da permettere la risospensione delle *Dynabeads*. Il "Washing Buffer", infine, è fornito nel kit alla concentrazione iniziale di 10X, ma viene utilizzato alla concentrazione finale di 1X.

Vengono pesati, per ciascun seme o farina, circa 50 mg, ulteriormente omogeneizzati, in entrambi i casi, mediante l'ausilio di un mortaio a mano.

L'omogeneato così ottenuto è trasferito in un *eppendorf* sterile, addizionato a 200 µl di *Dynabeads* (*Lysis Buffer*) e posto in incubazione per 15 minuti a 65 °C.

Successivamente, il campione viene lasciato per 5 minuti a temperatura ambiente, durante i quali non è richiesta un'agitazione continua.

A questo punto, si posiziona la provetta nell'apposito supporto magnetico per circa 1-2 minuti, al termine dei quali si getta via il surnatante, facendo attenzione a non disturbare il complesso gelatinoso DNA-*Dynabeads* formatosi.

Una volta rimosso il campione dal supporto magnetico, si aggiungono 200 µl di *Washing Buffer* (diluito alla concentrazione finale 1X), in una sola, rapida, azione in modo da staccare il complesso DNA-*Dynabeads* posizionato su un lato della provetta. Si lascia di nuovo il campione nell'apposito supporto magnetico per circa 30 secondi al termine dei quali si preleva il surnatante. Se il campione lo richiede, si può procedere ad un ulteriore lavaggio nelle esatte modalità sopra esposte.

A questo punto, si rimuove il campione dall'apposito supporto magnetico e si risospende il complesso DNA-*Dynabeads* in 20-40µl di *Resuspension Buffer*, agitando 30-40 volte con il puntale fino ad ottenere un soluzione omogenea.

Se richiesto, il DNA può essere eluito dalle *Dynabeads* mediante un'incubazione a 65 °C per 15 minuti, al termine dei quali si posiziona il campione nell'apposito supporto magnetico, e si trasferisce il surnatante in una nuova *ependorf* sterile.

Quantizzazione del DNA:

La quantizzazione del DNA è stata determinata mediante via spettrofotometrica, diluendo 5 µl di DNA estratto in 95 µl di acqua.

Per ricavare la concentrazione, in µg/µl si è utilizzata la seguente formula:

$$\mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{(\text{Abs}_{260} - \text{Abs}_{320}) \times 50 \times V_{\text{tot. Cuvetta}}}{\text{ml DNA} \times 1000}$$

In alternativa, il DNA è stato quantizzato direttamente su gel d'agarosio, all'1%, utilizzando come tampone di corsa il TAE 1X (Tris-acetato 0,04M, EDTA 0,0001M) e, come marcatore, il Marker IX (ΦX174 DNA-Hae III Digest).

Risultati e discussione

I semi moderni:

La comparazione, a livello proteico, dei tracciati elettroforetici dei semi moderni ha permesso di rilevare interessanti similitudini e differenze tra le due specie di *Phaseolus* prese in esame, *vulgaris* e *lunatus*.

In prima analisi, infatti, sulla base del pattern proteico è possibile distinguere i due principali *gene-pools* di appartenenza del genere *Phaseolus*: Mesoamericano ed Andino.

Tra le proteine di riserva analizzate, infatti, il gruppo delle faseoline, o viciline simili, rappresenta nei semi delle leguminose la componente proteica più abbondante (evidenziato, nella figura dai puntini blu) ed è costituito in entrambe le specie prese in esame da 3 subunità principali, con pesi molecolari differenti a seconda del *gene-pool* d'origine.

Mediante analisi densitometrica dei tracciati elettroforetici, infatti, nel gruppo Andino i pesi molecolari di ciascuna delle tre subunità variano in un *range* tra i 33,3 kDa e i 22 kDa, mentre per il pattern Mesoamericano i valori dei pesi molecolari comprendono dai 32 kDa ai 25 kDa:

Gene -pool	Subunità	Pesi Molecolari (kDa)
<u>Pattern Andino</u>	A	33,3
	B	26,0
	C	22,0
<u>Pattern Mesoamericano</u>	A	32,0
	B	28,1
	C	25,0

Tab. 7: pesi molecolari delle componenti faseoliniche in relazione al *gene-pool* di appartenenza.

I risultati trovati sono confermati anche a livello morfologico. E' noto, infatti che i due sottogruppi, Mesoamericano ed Andino, mostrino, a livello fenotipico, semi variabili in forma e dimensioni.

Tipici del *gene-pool* Mesoamericano, infatti, sono semi piccoli e rotondeggianti, caratteristici, ad esempio, delle razze Potato e Sieva. Al contrario, all'interno del *gene-pool* Andino, i semi si presentano di dimensioni decisamente maggiori, come nella varietà Big Lima, e generalmente piatti.

Le differenze a livello morfologico e proteico, pertanto, confermano l'esistenza dei due principali centri di origine e di domesticazione all'interno del genere *Phaseolus*, il primo situato nell'area Mesoamericana, il secondo in quella Andina.

L'elevata diversità morfologica sia nel *P. vulgaris* che nel *P. lunatus*, unita alla poca variabilità riscontrata a livello proteico, lascia supporre che la base genetica sia ristretta e che la grande differenziazione morfologica riscontrabile sia imputabile per lo più alle fasi di post-domesticazione, piuttosto che rappresentare una caratteristica delle popolazioni ancestrali.

La figura sottostante riporta l'analisi delle proteine di riserva, mediante SDS-PAGE, dei campioni moderni presi in esame e, di seguito, il relativo tracciato densitometrico:

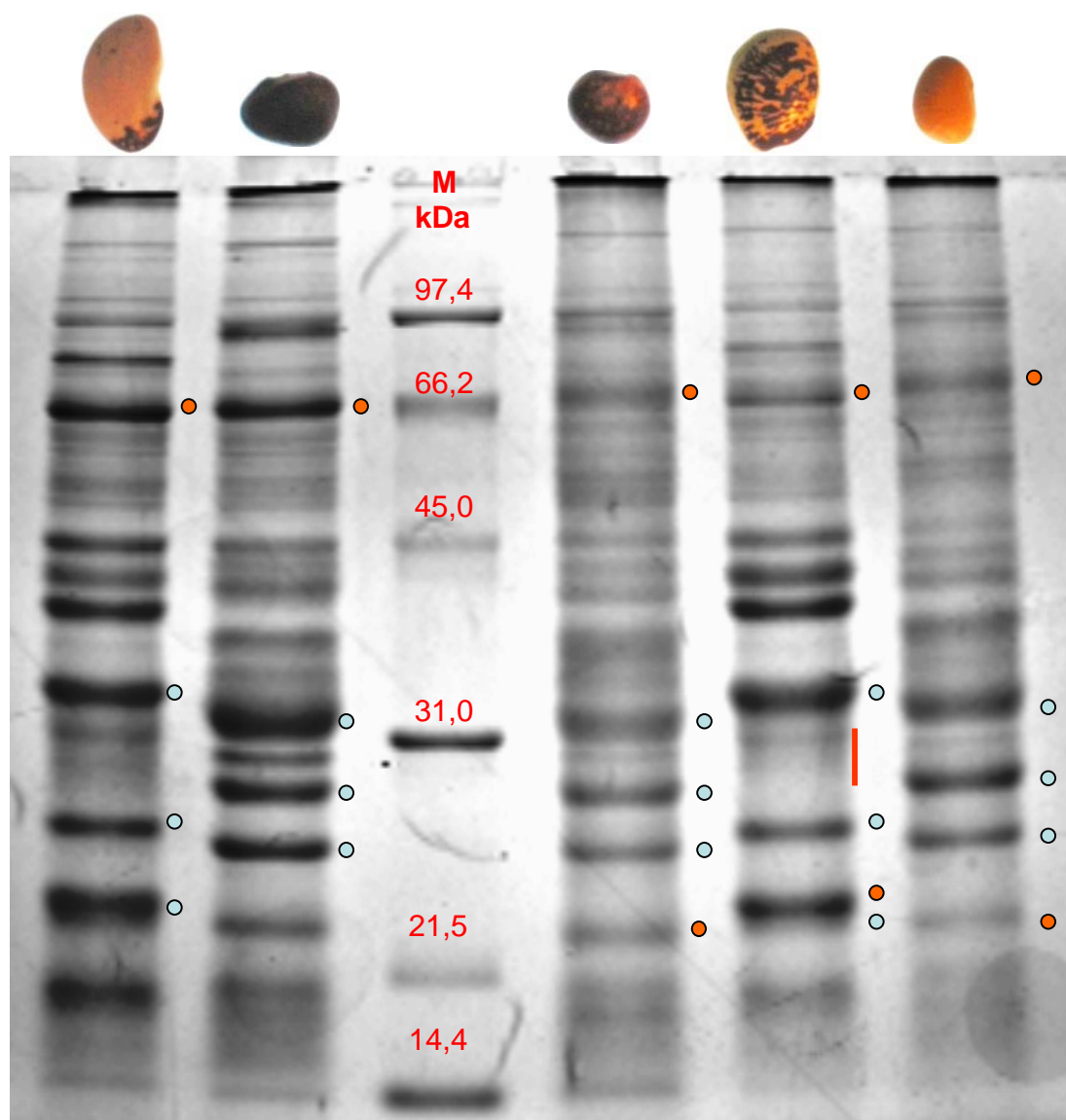


Fig.12: Pattern elettroforetico delle accessioni moderne di *Phaseolus lunatus* e *Phaseolus vulgaris*.

Da sinistra a destra: **PVM4:** *P. vulgaris*, pattern Andino; **PVM5:** *P. vulgaris*, pattern Mesoamericano; **PLM1:** *P. lunatus* var. Potato (pattern Mesoamericano); **PLM2:** *P. lunatus* var. Big Lima (pattern Andino); **PLM3:** *P. lunatus* var. Sieva (pattern Mesoamericano). **M:** marcatore molecolare, valori espressi in kDa.

I pallini azzurri indicano le componenti faseoliniche in ogni campione esaminato, mentre quelli arancioni le subunità leguminiche. La linea verticale indica le *Lima beans lectins related proteins*.

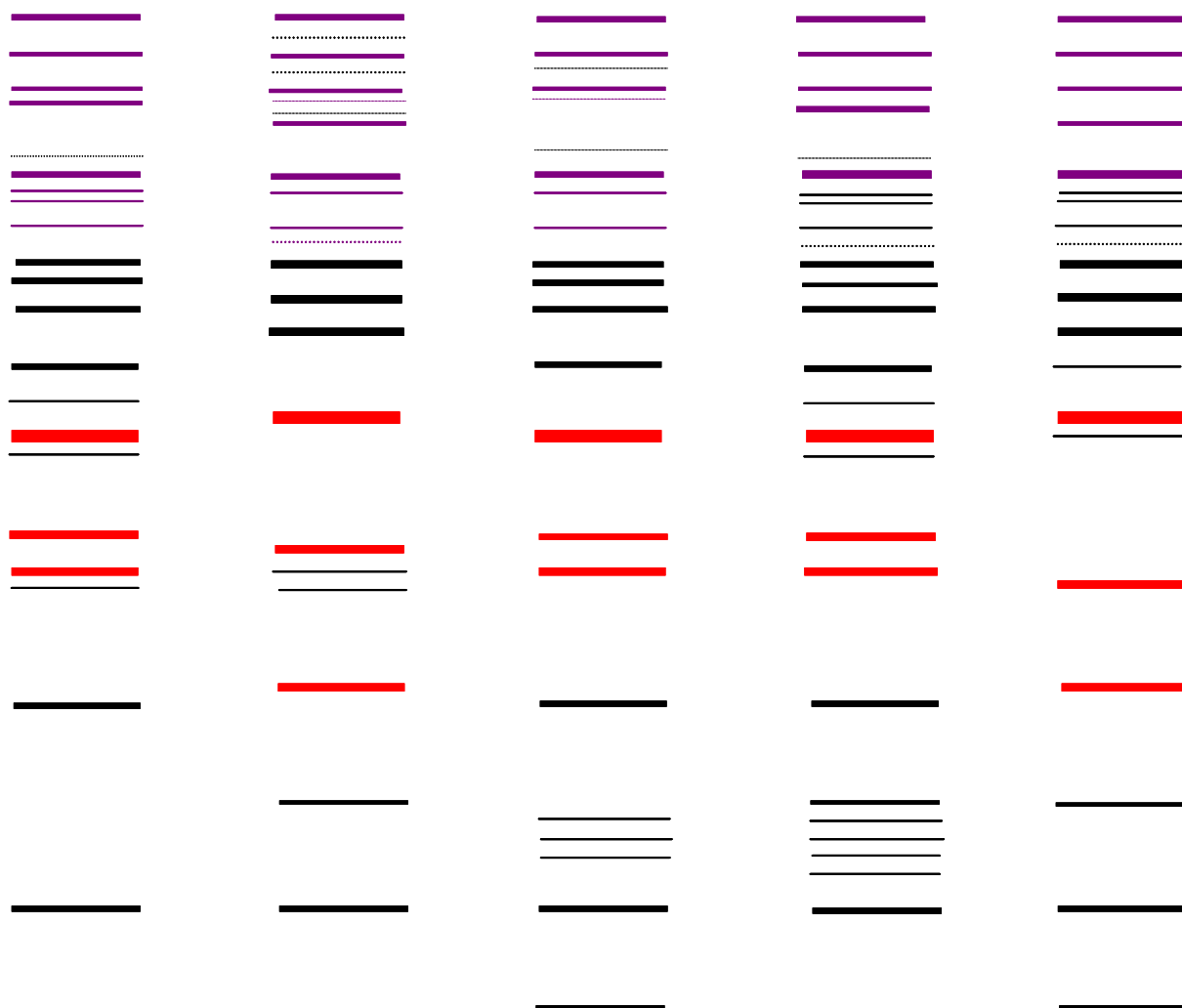


Fig. 13: Tracciato densitometrico dei campioni moderni di *P. lunatus* e *P. vulgaris*.

Da sinistra a destra: **PLM3:** *P. lunatus* var. Sieva (*pattern* Mesoamericano); **PLM2:** *P. lunatus* var. Big Lima (*pattern* Andino); **PLM1:** *P. lunatus* var. Potato (*pattern* Mesoamericano); **PVM5:** *P. vulgaris*, *pattern* Mesoamericano; **PVM4:** *P. vulgaris*, *pattern* Andino.

Come appare evidente dall'analisi elettroforetica e dal relativo tracciato densitometrico, alcune varietà del *P. lunatus* presentano un pattern decisamente simile a quello del *P. vulgaris*. Più nel dettaglio, il morfotipo Big Lima della specie *P. lunatus* e la varietà Andina del *P. vulgaris* mostrano indici di similarità piuttosto elevati e lo stesso si può riscontrare prendendo in considerazione la varietà Mesoamericana del *P. vulgaris* e i morfotipi Potato e Sieva appartenenti al *P. lunatus*. In quest'ultimo caso le principali differenze non risiedono tanto nelle componenti leguminiche e vicilinarie principali,

bensi a livello delle cosiddette *lectin related proteins*, importanti da un punto di vista ecologico ed indice, pertanto, di una diversa adattabilità ambientale.

L'analisi elettroforetica, confermata dagli indici di similitudine (elaborati sulla base dell'indice di Nei e Li, 1979), sembrerebbe confermare, oltre alla presenza di due centri di origine principali per entrambe le specie, una possibile vicinanza filogenetica del *P. vulgaris* al *P. lunatus*.

Contrariamente a quanto sostengano alcuni Autori, che considerano il *P. lunatus* non relazionabile, dal punto di vista evolutivo con il complesso *P. vulgaris*-*P. coccineus*, l'alta similarità riscontrata a livello proteico sembrerebbe suggerire per lo meno due principali centri di origine, comuni ad entrambe queste specie, uno situato in Mesoamerica, l'altro nelle regioni Andine. In accordo con alcuni dei più recenti lavori, il *P. lunatus* sembrerebbe relazionabile dal punto di vista filogenetico al complesso ipotizzato per il *P. vulgaris*, dati, questi, confermati anche a livello genetico.

La figura sottostante mette in evidenza la matrice di similarità calcolata per tutte le cinque specie di *Phaseolus* moderno prese in esame, sulla base dell'indice di Nei e Li, 1979:

% di Similarità:					
	PLM 3	PLM 2	PLM 1	PVM 5	PVM 4
PLM 3	0.000	0.384	0.894	0.810	0.384
PLM 2	0.384	0.000	0.400	0.592	0.895
PLM 1	0.894	0.400	0.000	0.681	0.370
PVM 5	0.810	0.592	0.681	0.000	0.480
PVM 4	0.384	0.895	0.370	0.480	0.000

Tab. 8: Indice di similarità calcolato sulla basa di Nei e Li (1979) per le specie moderne di *P. vulgaris* e *P. lunatus*.

PLM1: *P. lunatus* var. Potato (*pattern* Mesoamericano); **PLM2:** *P. lunatus* var. Big Lima (*pattern* Andino);

PLM3: *P. lunatus* var. Sieva (*pattern* Mesoamericano); **PVM4:** *P. vulgaris*, *pattern* Andino;

PVM5: *P. vulgaris*, *pattern* Mesoamericano.

I semi antichi:

I campioni antichi provenienti dal sito archeologico peruviano, nel Sud del Perù, sono stati comparati con i rispettivi semi attuali appartenenti allo stesso genere. L'analisi è stata effettuata mediante tecniche elettroforetiche in condizioni denaturanti, in modo da verificare il grado di conservazione delle principali subunità proteiche.

In linea generale, allo stato attuale della letteratura, è riportato che la frazione globulinica è maggiormente soggetta a degradazione nei campioni antichi, mentre, al contrario, quella prolaminica di alcuni cereali sembra essere la meglio conservabile (Durante *et al.*, 1988; Shewry *et al.*, 1982).

I risultati ottenuti, come sarà successivamente illustrato nei prossimi paragrafi, confermano quanto sopra esposto, dal momento che la frazione prolaminica del mais, le zeine, sono risultate le proteine meglio conservate anche se diversamente rappresentate in ciascun campione.

Particolare attenzione, inoltre, è stata posta al metodo di estrazione scelto: nel caso del mais, infatti, si è proceduto mediante estrazione differenziale, in modo da separare le diverse classi proteiche; per quanto riguarda *Phaseolus*, invece, è stata testata più di una metodologia, dal momento che il grado di conservazione del campione nonché il suo stato di purezza sono risultati piuttosto scarsi.

In linea generale, il protocollo di estrazione mediante tampone Tris-HCl, è risultato il più ottimale in termini di contenuto proteico. La quantizzazione di ciascun estratto, ottenuta mediante reazione colorimetrica (*Bio-Rad Protein Assay Kit II*) ha mostrato valori decisamente più alti rispetto all'estrazione con il tampone sodio-borato (dati non mostrati), consentendo una migliore visualizzazione delle subunità proteiche su gel di poliacrilamide. I problemi relativi alla conservazione della frazione globulinica nelle Dicotiledoni, inoltre, sono dovuti principalmente al metodo di estrazione, dal momento che le maggiori subunità proteiche possono perdersi durante la dialisi, riducendo anche considerevolmente la concentrazione dell'estratto. Per questi motivi, infatti, la scelta del metodo di estrazione ha riguardato in primo luogo l'utilizzo di tamponi privi di sali, in modo da non dover ricorrere alla dialisi prima dell'analisi su gel.

La successiva separazione elettroforetica, infine, è avvenuta in condizioni denaturanti, mediante SDS-PAGE, ed i rispettivi *patterns* elettroforetici sono stati di seguito analizzati tramite densitometria diretta. Dove possibile, in relazione, pertanto, allo stato di conservazione del campione, si è cercato di mettere in evidenza le relazioni evolutive nei confronti dei rispettivi campioni attuali, sulla base degli indici di similitudine (Nei *et al.*, 1979).

I semi antichi: *Phaseolus* spp.:

Per quanto riguarda l'analisi delle proteine di riserva nei semi antichi, sono state prese in considerazione le due principali specie più diffuse in Sud America: *P. vulgaris* e *P. lunatus*. I risultati, nel complesso, possono dirsi soddisfacenti.

I campioni, provenienti dalle regioni di Ilo e Cahuachi, nel Sud del Perù, hanno una datazione variabile dal 900 a. C. al 900 d. C, per le accessioni del *P. lunatus* prese in esame, e dal 200 al 400 a.C. per quelle del *P. vulgaris*.

La variabilità proteica all'interno del *Phaseolus lunatus* e del *Phaseolus vulgaris* è stata saggiata mediante SDS-PAGE, in condizioni, quindi, denaturanti, al fine di verificare il grado di conservazione delle principali subunità proteiche. I principali problemi sulla frazione globulinica sono dovuti soprattutto al metodo di estrazione, dal momento che le maggior frazioni proteiche possono perdersi durante la dialisi. In prima analisi, quindi, particolare attenzione è stata rivolta al metodo di estrazione al fine di trovare un tampone utilizzabile su entrambe le specie studiate e che non contenesse sali.

Tra i metodi di estrazione testati, il tampone TRIS-HCl (v. Materiali e Metodi) si è rivelato il più efficace in termini di resa quantitativa, probabilmente perché non prevede l'utilizzo della dialisi.

I risultati relativi alla quantizzazione, infatti, hanno mostrato valori paragonabili a quelli ottenuti per i semi moderni (risultato non mostrato), fornendo subito una prima indicazione sul grado di conservazione proteica.

Le successive analisi elettroforetiche hanno permesso di rilevare la presenza di bande conservate in tutti i campioni, anche se la loro visibilità è fortemente ostacolata dalla presenza di una colorazione scura lungo tutta la *lane*, dovuta, forse, alla frammentazione di alcune subunità proteiche, distribuite secondo un gradiente uniforme di pesi molecolari, o, più probabilmente, all'interferenza di alcuni sostanze ossidanti nei campioni mummificati.

Tra le accessioni antiche di *Phaseolus* spp. esaminate, quelle di *P. vulgaris* sono risultate le peggio conservate a livello di degradazione proteica, probabilmente imputabile ad una scarsa conservazione del campione. Nel campione PVA 5, infatti, sono rilevabili solo due componenti ad alto peso molecolare, di circa 67,7 kDa e 74,7 kDa, probabilmente ascrivibili alle subunità leguminiche, mentre nel campione PVA 6 sono evidenziabili più bande discrete, nonostante, come detto, una colorazione diffusa ne ostacoli la completa visualizzazione. I pesi molecolari di due delle bande rilevabili risultano intorno ai 47,5 kDa ed ai 45,4 kDa e sono pertanto ascrivibili alle *lectin related proteins*. Le altre bande, a più basso peso molecolare, sono comprese in un *range* tra i 31,9 kDa ed i 26,4 kDa, e sono

probabilmente relazionabili al gruppo delle faseoline. Componenti a basso peso molecolare, comprese tra i 21,5 kDa e i 14,4 kDa, sono rilevabili per lo più come bande diffuse e non è possibile, pertanto una loro più chiara identificazione. Sulla base dei soli pesi molecolari, inoltre, è difficile giungere ad un'identificazione, più precisa del *pool* genico di appartenenza, Mesoamericano o Andino, in quanto il peso molecolare delle accessioni studiate non trova un'esatta corrispondenza con i rispettivi campioni moderni. A livello morfologico, tuttavia, le accessioni antiche oggetto di studio sembrano più simili per dimensioni alle varietà Mesoamericane, ma, anche in questo caso, una più precisa identificazione non è possibile, per via della scarsa conservazione del campione. Ulteriori analisi, come l'utilizzo di anticorpi, potranno rivelarsi utili nello studio di questa specie.

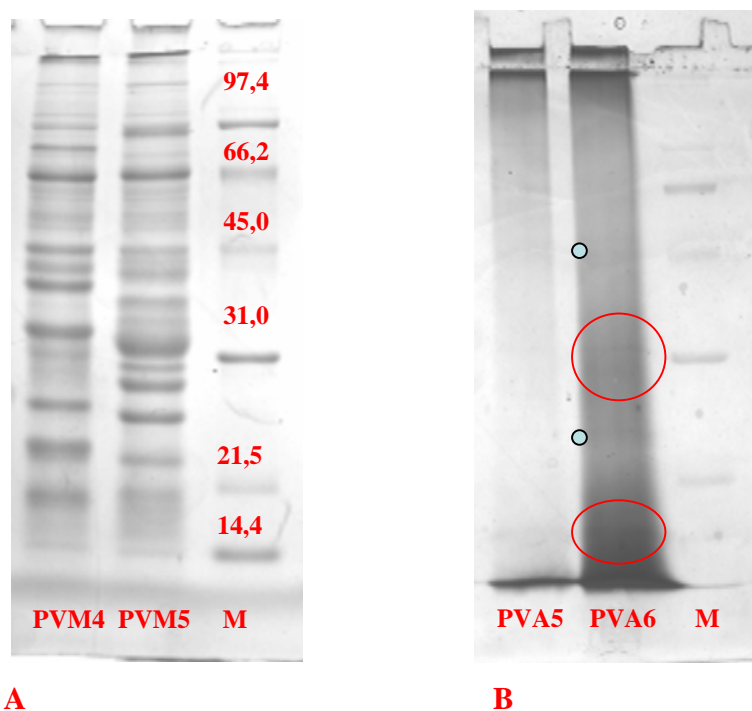


Fig.14: corsa elettroforetica dei semi di *Phaseolus vulgaris* moderni (A) ed antichi (B). Le circonferenze indicano la presenza di bande diffuse, mentre i tondi piene le bande discrete. **PVM4:** *Phaseolus vulgaris*, pattern andino; **PVM5:** *Phaseolus vulgaris*, pattern mesoamericano; **PVA5:** *Phaseolus vulgaris*, loc. Cahuachi ; **PVA6:** *Phaseolus vulgaris*, loc. Ilo . **M:** Marker, valori espressi in kDa.

Per quanto concerne le accessioni di *Phaseolus lunatus* prese in esame, tutti i campioni mostrano *pattern* elettroforetici molto simili, indipendentemente dal grado di conservazione e dalla loro presunta datazione. Le componenti meglio conservate sono ad alto peso molecolare, probabilmente ascrivibili al gruppo delle proteine legumine-simili, sulla base del confronto con semi di *Phaseolus lunatus* attuale. In figura 15 è riportata la corsa elettroforetica completa dei campioni PLA1, PLA 2, PLA 3, PLA 4 e, nella figura successiva, un dettaglio che mette in evidenza le componenti ad alto peso molecolare. Nel campione PLA 2, inoltre, oltre alle probabili componenti leguminiche, è riscontrabile anche la presenza di una banda a più basso peso molecolare, probabilmente corrispondente alle cosiddette *lectin related proteins*. Occorre premettere, tuttavia, che una precisa determinazione delle subunità proteiche sulla base solo del peso molecolare non è da considerarsi del tutto attendibile, dal momento che, nei semi antichi, la degradazione di alcune componenti proteiche può alterarne la mobilità durante la corsa elettroforetica.

Ben conservate, inoltre, in tutti i campioni, sembrerebbero essere le componenti faseoliniche, distinguibili in due bande nette di circa 33 kDa e 22 KDa, oltre che bande diffuse, non facilmente rilevabili ed a basso peso molecolare. La presenza delle faseoline permette anche di discriminare il *pool* genico di appartenenza per le accessioni esaminate. Il peso molecolare, infatti, è corrispondente alla varietà Big Lima del *Phaseolus lunatus* moderno, appartenente, a sua volta, al *pool* genico Andino. A livello morfologico, tuttavia, soltanto due delle accessioni esaminate presentano caratteristiche simili, in termini di dimensioni e colore, alle varietà attuali del *P. Lunatus* andino.

I restanti campioni, al contrario, sono a varietà a seme piccolo, più tipiche dell'area Mesoamericana. L'apparente contraddizione dei dati riscontrati può essere spiegata prendendo in considerazione la distribuzione delle varietà a seme piccolo attuali, rilevabile non solo nel Centro America, ma anche nelle regioni colombiane ed ecuadoriane fino all'Argentina. Al contrario, le accessioni a seme grande, tipiche delle località Andine, hanno una distribuzione geografica più limitata, che va dalla Colombia, all'Ecuador, al Nord del Perù. Prendendo in considerazione la datazione dei reperti archeologici oggetto di studio, la più antica varietà a seme piccolo di *Phaseolus lunatus* prese in esame risale al 900 a.C., mentre le altre mostrano una datazione più recente, compresa tra il 200 a.C. ed il 400 d.C., e risultano co-stratificate con le varietà a seme grande del *P. lunatus*.

Le varietà a seme piccolo, quindi, erano presenti nel territorio andino, lungo la costa peruviana, nel 900 a.C. ma, trattandosi di forme presumibilmente già domestiche, resta da chiarire se, in accordo con altri Autori, queste varietà a seme piccolo si siano originate proprio nell'area andina, o se siano state introdotte successivamente a partire dalle regioni Mesoamericane e poi integrate nell'agricoltura locale

Sud-Peruviana (Kaplan e Lynch, 1999). Allo stato attuale, infatti, le evidenze archeologiche, indicano che l'introduzione del *P. lunatus* nell'agricoltura Mesoamericana è avvenuta successivamente rispetto alle regioni andine, dove i resti del fagiolo comune e del *P. lunatus* precedono quelli mesoamericani di almeno 2000 anni. La contemporanea presenza, riscontrata in questo studio, di forme domestiche sia del *P. lunatus* che del *P. vulgaris* nelle regioni andine, unita alle altre evidenze archeologiche che suggeriscono una precoce distribuzione di queste specie nel Sud America rispetto alle regioni Mesoamericane, sembra indicare proprio nel Sud America un possibile centro di origine e di differenziazione di queste specie. L'analisi delle proteine di riserva in *P. lunatus* sembrerebbe confermare una localizzazione andina anche per le accessioni a seme piccolo, ma i dati dovranno essere ulteriormente confermati mediante, ad esempio, *immunoblotting* o sequenziamento delle frazioni proteiche riscontrate. Lo studio, inoltre, delle faseoline in ulteriori reperti antichi, può contribuire a fornire nuovi interessanti risultati sull'origine e la diffusione di questo genere.

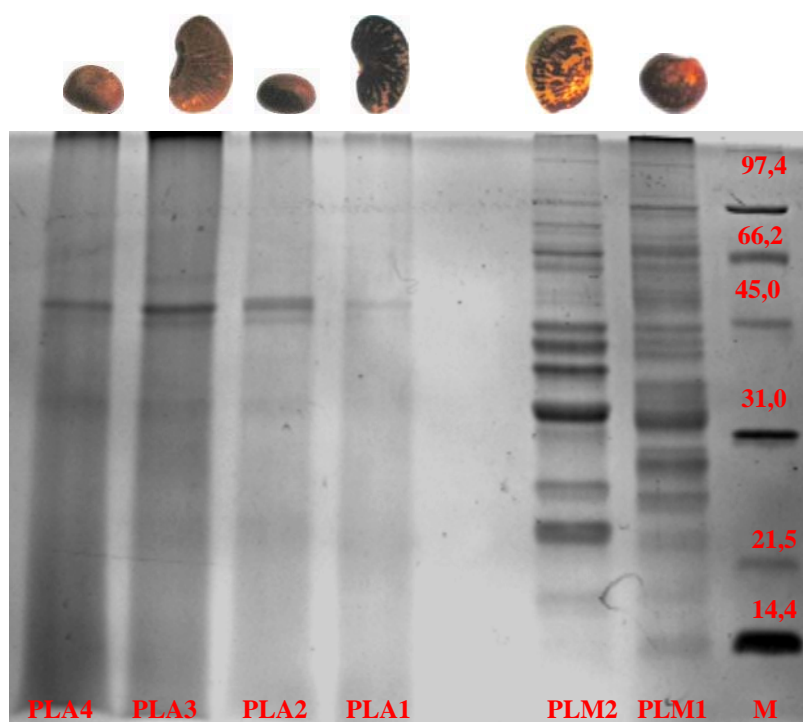


Fig. 15: corsa elettroforetica dei campioni *Phaseolus lunatus*, moderni ad antichi.

PLM1: *Phaseolus lunatus* moderno, var. Potato; **PLM2:** *Phaseolus lunatus* moderno, var. Big Lima; **PLA1:** *Phaseolus lunatus* antico, loc. Ilo ; **PLA2:** *Phaseolus lunatus* antico, loc. Ilo ; **PLA3:** *Phaseolus lunatus* antico, loc. Cahuachi ; **PLA4:** *Phaseolus lunatus* antico, loc. Cahuachi ; **M:** Marker, valori espresso in kDa.

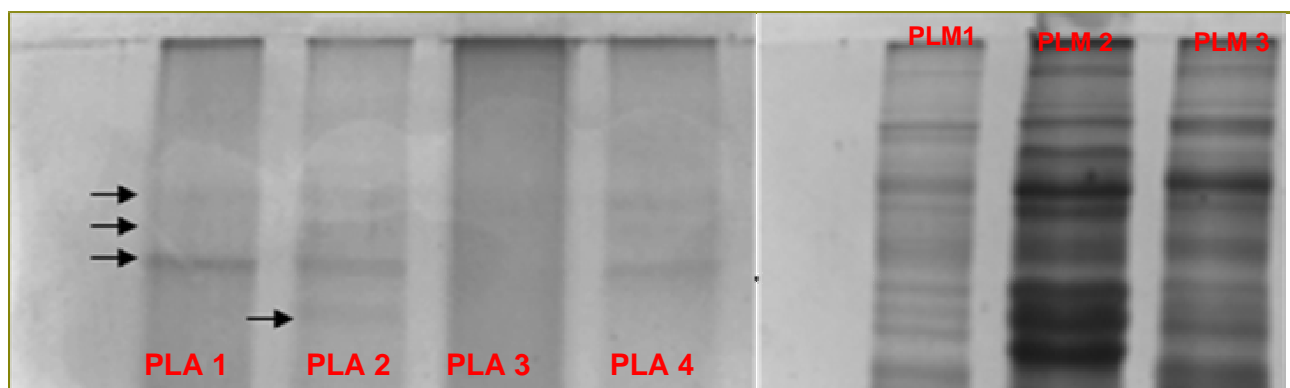


Fig. 16: dettaglio della corsa elettroforetica dei campioni *Phaseolus lunatus*, moderni ad antichi. Le frecce indicano la presenza di bande discrete.

PLM1: *Phaseolus lunatus* moderno, var. Potato; **PLM2:** *Phaseolus lunatus* moderno, var. Big Lima; **PLA1:** *Phaseolus lunatus* antico, loc. Ilo ; **PLA2:** *Phaseolus lunatus* antico, loc. Ilo ; **PLA3:** *Phaseolus lunatus* antico, loc. Cahuachi ; **PLA4:** *Phaseolus lunatus* antico, loc. Cahuachi.

I semi antichi: Zea mais

L'analisi delle proteine di riserva in *Zea mais* è stata svolta su cinque campioni ritrovati nelle località di Ilo e Cahuachi e datati in un *range* che va dal 200 a.C. al 500 d.C..

A una prima analisi, alcuni dei campioni presi in esame, risultavano, molto probabilmente, cotti, mentre altri venivano generalmente usati per ottenere la *chicha*, una bevanda fermentata, a base di mais, tipica delle colture precolombiane ed in uso tutt'oggi.

I risultati elettroforetici su mais possono dirsi, nel complesso, soddisfacenti. L'estratto proteico di ciascun campione, infatti, è stato ottenuto mediante un'estrazione differenziale delle principali componenti proteiche. La frazione SN2 rappresenta la componente glutelinica solubile in sali, la SN4 le prolamine (nel mais principalmente zeine) mentre la SN5 le gluteline alcol insolubili.

Ciascuna frazione così ottenuta è stata quantizzata (dati non mostrati), dializzata, (ad eccezione della componente SN4) e precipitata con acetone (v. Materiali e Metodi), al fine di concentrare e purificare l'estratto proteico. A questo punto, per tutte le frazioni ottenute si è proceduto mediante analisi elettroforetica in condizioni denaturanti (SDS-PAGE), nelle stesse condizioni già testate per i semi antichi di *Phaseolus* spp.. Le figure 17-19 mostrano i risultati elettroforetici ottenuti per ciascuna frazione che, nel complesso, possono dirsi soddisfacenti. La frazione SN4, contenente le proteine alcol solubili, è risultata, infatti, la meglio conservata in tutti i campioni esaminati. In accordo con quanto sostengono Durante *et al.* (1988) la frazione prolamina dei cereali appare non solo la più abbondante,

ma anche la meglio conservata nei campioni antichi. Le frazioni zeiniche, infatti, la componente principale nelle proteine di riserva del mais, sono diversamente rappresentate anche nei semi antichi da una serie di bande nette, ben evidenziabili, il cui peso molecolare è compreso tra i 10 kDa ed i 28 kDa. Le subunità α di 19kDa e 22 kDa sono presenti in tutti i campioni, mentre la subunità γ , di circa 28 kDa è presente solo in due dei campioni esaminati, mentre risulta assente nelle altre accessioni. In tutti i campioni antichi, inoltre, è presente una componente di circa 23 kDa che sembra essere assente nel campione moderno scelto come confronto. In ultima analisi, infine, l'estrazione con alcol e sostanze riducenti ha permesso di rilevare anche componenti prolaminiche a più alto peso molecolare, rispettivamente di 35,8, 36,9 e 40,3 kDa, evidenziabili anche in due dei campioni antichi esaminati (MA4 e MA5) che risultano, pertanto, quelli meglio conservati.

Il *pattern* densitometrico della frazione in esame è mostrato in figura 20. Delle frazione zeinica, inoltre, è stato calcolato l'indice di similarità in accordo con Nei e Li (1979) al fine di illustrare la percentuale di similitudine tra i campioni antichi e la varietà peruviana moderna (cv. "Giallo Morado") scelta come confronto.

Per quanto concerne, invece, le restanti frazioni estratte, la componente SN2 risulta diversamente rappresentata ed i campioni meglio conservati sembrano essere MA1, MA2 ed MA3 in cui sono evidenziabili bande nette lungo tutta la *lane*, principalmente localizzate a basso peso molecolare.

Nei restanti campioni, invece, si nota soltanto una colorazione diffusa, con tracce di frazioni proteiche a basso peso molecolare, sotto ai 14,5 kDa. Nemmeno dopo ripetuti tentativi di purificazione degli estratti proteici si è riusciti a localizzare la presenza di bande discrete in queste accessioni, in cui lo stato di degradazione sembra essere, pertanto, decisamente maggiore rispetto agli altri semi esaminati.

La scarsa conservazione della frazione SN2, unita alla possibile presenza di sostanze inquinanti, come, ad esempio, i fenoli, è un problema evidente anche nelle restanti accessioni, in cui sono evidenziabili bande a basso peso molecolare, tra i 9,7 kDa ed i 10 kDa, oltre una serie di bande, nel campione MA2, dal peso molecolare medio di circa 27,2 kDa. Le componenti a basso peso molecolare, inoltre, trovano corrispondenza anche nel campione moderno esaminato, in cui risulta ben evidenziabile una componente a 13,7 kDa, oltre che bande a più basso peso molecolare.

Nelle accessioni meglio conservate, (MA1 ed MA2), inoltre, sono evidenziabili due bande nette intorno ai 53,4 kDa ed ai 66 kDa, oltre che, nel campione MA1, bande discrete dal peso molecolare compreso tra i 23,7 ed i 39,8 kDa.

L'ultima frazione analizzata, la SN5, comprende proteine alcol insolubili e, anche in questo caso, le frazioni proteiche non risultano ben conservate nei semi antichi.

Nonostante nel campione moderno le componenti proteiche siano tutte ben evidenziabili e dislocate a pesi molecolari diversi lungo tutta la *lane*, nelle accessioni antiche prese in esame sono le componenti a basso peso molecolare che, ancora un a volta, risultano le meglio conservate.

Bande diffuse, infatti, intorno ai 14,5 kDa, sono evidenziabili in tutti i campioni ma l'accessione meglio conservata, l'MA2, presente tracce sufficientemente distinte di bande a più alto peso molecolare, localizzate dai 25 kDa ai 18 kDa e bande nette ad alto peso molecolare, intorno agli 80 kDa. La scarsa conservazione delle componenti gluteliniche, ben evidente in alcune delle accessioni esaminate, potrebbe essere imputabile anche al tipo di trattamento che il campione può aver subito.

Alcune delle accessioni esaminate, infatti, sono state probabilmente cotte (campioni MA4 ed MA5), mentre altre presumibilmente lasciate essiccare per ottenere la tipica bevanda fermentata, la *chicha* (campione MA3). Trattandosi di alimenti, il tipo di trattamento subito può aver influenzato la solubilità proteica ma fornisce, d'altro canto, interessanti considerazioni sulle abitudini alimentari nelle società precolombiane, confermando l'importanza di questo cereale nell'agricoltura sud peruviana.

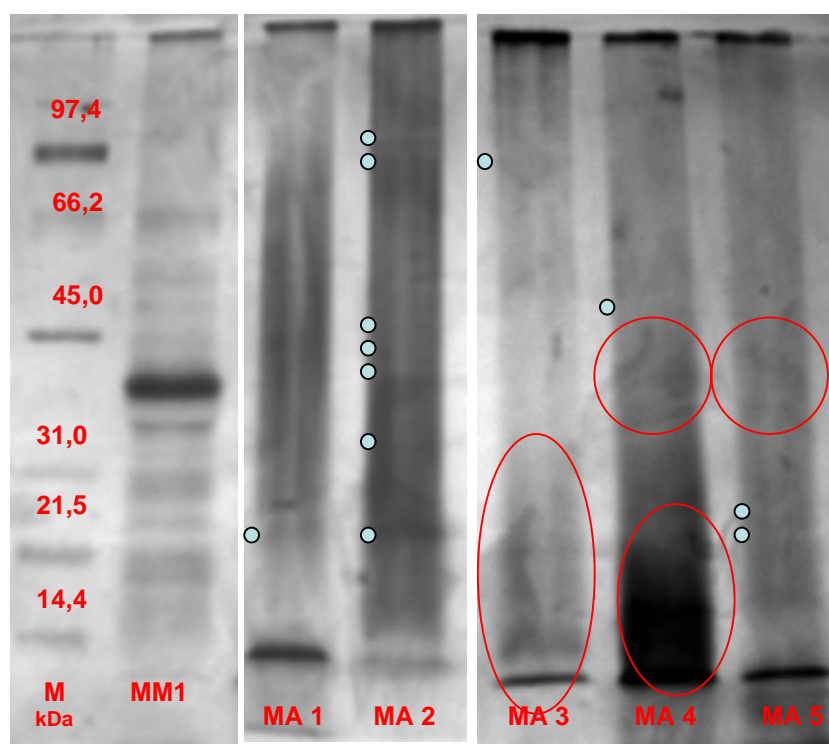


Fig. 17: analisi elettroforetica della frazione **SN5** da semi di mais antichi e moderni. I pallini azzurri indicano la presenza di bande discrete, mentre le circonferenze in rosso tracce di bande diffuse. **M:** marcatore, valori espressi in kDa.

MM1: mais moderno, cv. Giallo Morado; **MA1:** mais antico, loc. Ilo; **MA2:** mais antico, località Cahuachi; **MA3:** mais antico, loc. Cahuachi; **MA4:** mais antico, loc. Ilo ; **MA5:** mais antico, loc. Ilo.

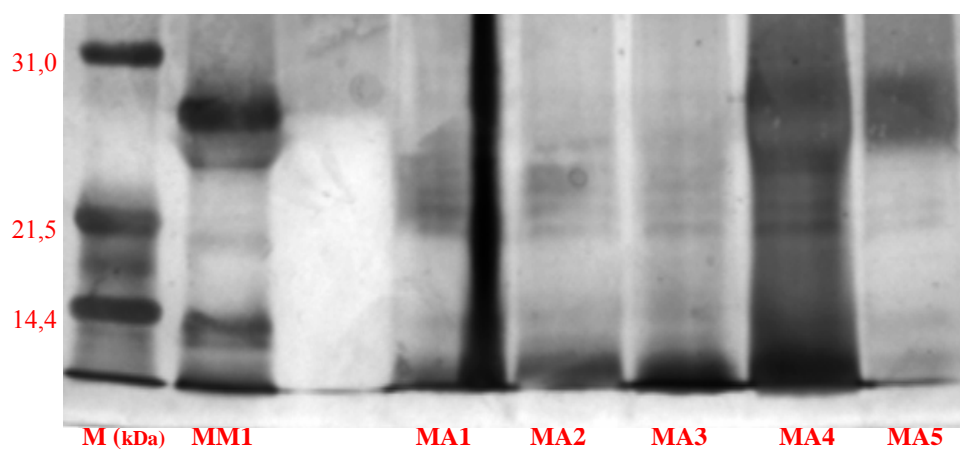


Fig. 18.: Analisi elettroforetica della frazione SN4 da semi di mais antichi e moderni. **MM1:** mais moderno, cv. Giallo Morado; **MA1:** mais antico, loc. Ilo; **MA2:** mais antico, località Cahuachi; **MA3:** mais antico, loc. Cahuachi; **MA4:** mais antico, loc. Ilo ; **MA5:** mais antico, loc. Ilo. **M:** marcatore, valori espressi in kDa.

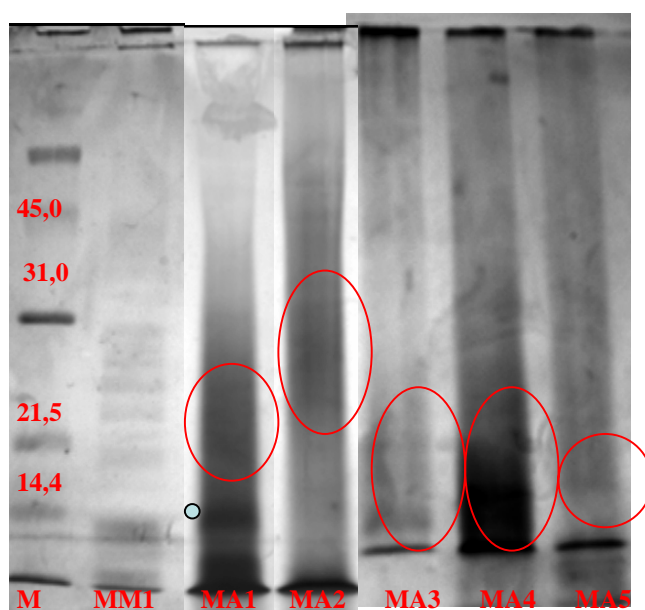
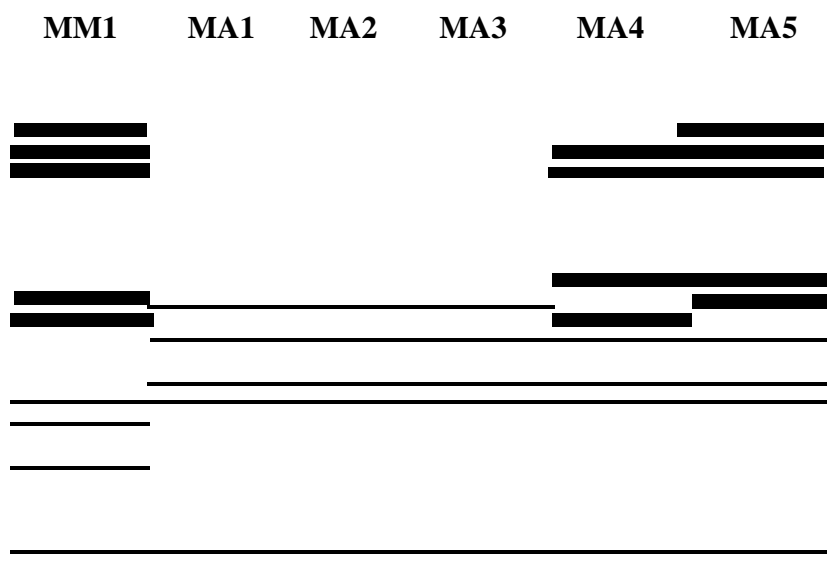


Fig. 19: corsa elettroforetica della frazione SN2 da semi antichi di mais. **MM1:** mais moderno, cv. Giallo Morado; **MA1:** mais antico, loc. Ilo; **MA2:** mais antico, località Cahuachi; **MA3:** mais antico, loc. Cahuachi; **MA4:** mais antico, loc. Ilo ; **MA5:** mais antico, loc. Ilo. **M:** marcatore, valori espressi in kDa.

A:**B:**

% di similarità						
	MM1	MA1	MA2	MA3	MA4	MA5
MM1	0.000	0.189	0.189	0.189	0.294	0.353
MA1	0.189	0.000	1.000	1.000	0.545	0.500
MA2	0.189	1.000	0.000	1.000	0.545	0.500
MA3	0.189	1.000	1.000	0.000	0.545	0.500
MA4	0.294	0.545	0.545	0.545	0.000	0.750
MA5	0.353	0.500	0.500	0.500	0.750	0.000

Fig. 20: A: Tracciato densitometrico della frazione zeinica. **B:** indice di similarità per la frazione zeinica calcolato in accordo con Nei e li, 1979 **MM1:** mais moderno, cv. Giallo Morado; **MA1:** mais antico, loc. Ilo; **MA2:** mais antico, località Cahuachi; **MA3:** mais antico, loc. Cahuachi; **MA4:** mais antico, loc. Ilo ; **MA5:** mais antico, loc. Ilo.

Le farine:

Oltre alla caratterizzazione proteica sui semi, sono state prese in considerazione anche alimenti antihi, provenienti dalle regioni Sud peruviane di Ilo e Cahuachi e rinvenuti come offerte votive nel corso degli scavi archeologici, organizzati dal progetto Nasca.

I campioni presi in esame sono tre diverse farine rinvenute in urne votive e probabilmente utilizzate come alimento nelle società precolombiane.

Lo scopo del lavoro, in quest'ambito, è stato rivolto essenzialmente all'identificazione della composizione alimentare delle tre farine oggetto di studio, in modo da comprovare, a livello molecolare, le prime evidenze archeologiche. Con questo fine, si è proceduto, pertanto, ad estrazioni differenziali per *Zea mais* e per *Phaseolus* spp., utilizzando gli stessi protocolli già testati per l'analisi dei semi per valutare se, anche in questo caso, fosse possibile rilevare differenze quali/quantitative ed allo scopo, quindi, di mettere a punto un protocollo di estrazione idoneo.

I risultati ottenuti saranno discussi in due distinti paragrafi, sulla base dei dati riscontrati per ciascun metodo di estrazione testato.

Estrazione per *Phaseolus* spp.:

Per verificare la presenza di *Phaseolus* spp. all'interno dei campioni analizzati sono stati testati due metodi di estrazione, il primo che prevede l'utilizzo del tampone sodio-borato, il secondo quello del Tris-Hcl (v. Materiali e Metodi). Contrariamente a quanto riscontrato per i semi, nessuno dei due metodi, tuttavia, ha messo in evidenza grosse differenze quantitative, anche se la concentrazione dell'estratto proteico risultava comunque lievemente superiore nel caso dell'utilizzo del tampone Tris-HCl risultato dovuto, probabilmente, all'assenza di dialisi (dati non mostrati).

In entrambi i casi, inoltre, il problema principale si è rivelato la scarsa purezza dell'estratto proteico, dovuta, probabilmente, all'interferenza di sostanze riducenti o ossidanti, che, in alcuni casi, conferivano anche colorazioni particolari ai campioni estratti.

La poca purezza del campione, unita ad un alto grado di degradazione proteica, hanno interferito notevolmente sulle successive analisi elettroforetiche effettuate in condizioni denaturanti, mediante SDS-PAGE. Durante il corso delle prime analisi non è stato possibile rilevare la presenza di bande discrete nella maggior parte dei campioni ma, piuttosto, era predominante una colorazione diffusa lungo tutta la *lane*.

Solo in seguito a precipitazione e lavaggio con acetone assoluto ed all'80% (v. Materiali e Metodi) è stato possibile rilevare, la presenza di bande discrete ad alto peso molecolare in uno dei campioni analizzati, LP1, presumibilmente ascrivibili alla stessa frazione leguminica già presente nei semi antichi testati. Per ovviare al problema ed ottenere una maggiore purificazione dell'estratto proteico, si è proceduto ad analisi cromatografica, mediante cromatografia ad esclusione G 50, degli estratti proteici ed i risultati ottenuti sono visualizzabili in figura 22.

In seguito ad analisi cromatografica, anche nel campione LP3 è stato possibile visualizzare la presenza delle stesse bande discrete, ad alto peso molecolare, già presenti nel campione LP1, oltre che tracce di bande a più basso peso molecolare, per lo più diffuse ed intorno ai 14 kDa.

In entrambi i campioni le componenti proteiche sono le stesse riscontrate anche nei semi antichi, ma una caratterizzazione più precisa delle specie di *Phaseolus* presenti, sulla base di questi dati non è possibile. L'aspetto singolare è che, a differenza dei semi antichi, non sono trovate le componenti faseoliniche che, nei semi delle leguminose, rappresentano la frazione globulinica più cospicua.

Dal momento che i metodi di estrazione utilizzati sono gli stessi di quelli usati per i semi antichi, il diverso grado di conservazione proteica riscontrato può dipendere dal particolare tipo di trattamento subito dal campione stesso. In questo caso, infatti, si tratta di alimenti antichi ed alcune procedure, come, per esempio, la cottura, potrebbero aver alterato la composizione o la solubilità proteica, prendendo in considerazione anche il fatto che la frazione globulinica è, generalmente, molto poco conservabile.

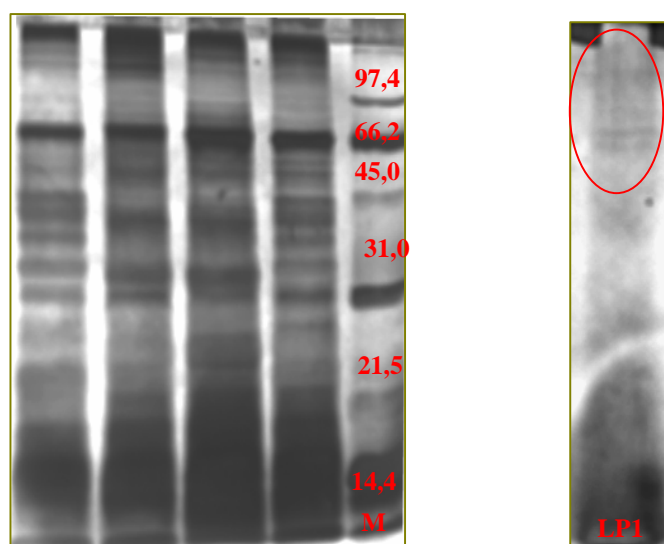


Fig. 21: Estrazione per *Phaseolus* del campione LP1. Da sinistra a destra, *Phaseolus lunatus* **PLM2** e **PLM1**; *Phaseolus vulgaris* **PVM5** e **PVM4**; **M**: marcatore, valori espressi in kDa; Farina nativa **LP1**. I cerchi rossi indicano la presenza di bande diffuse.

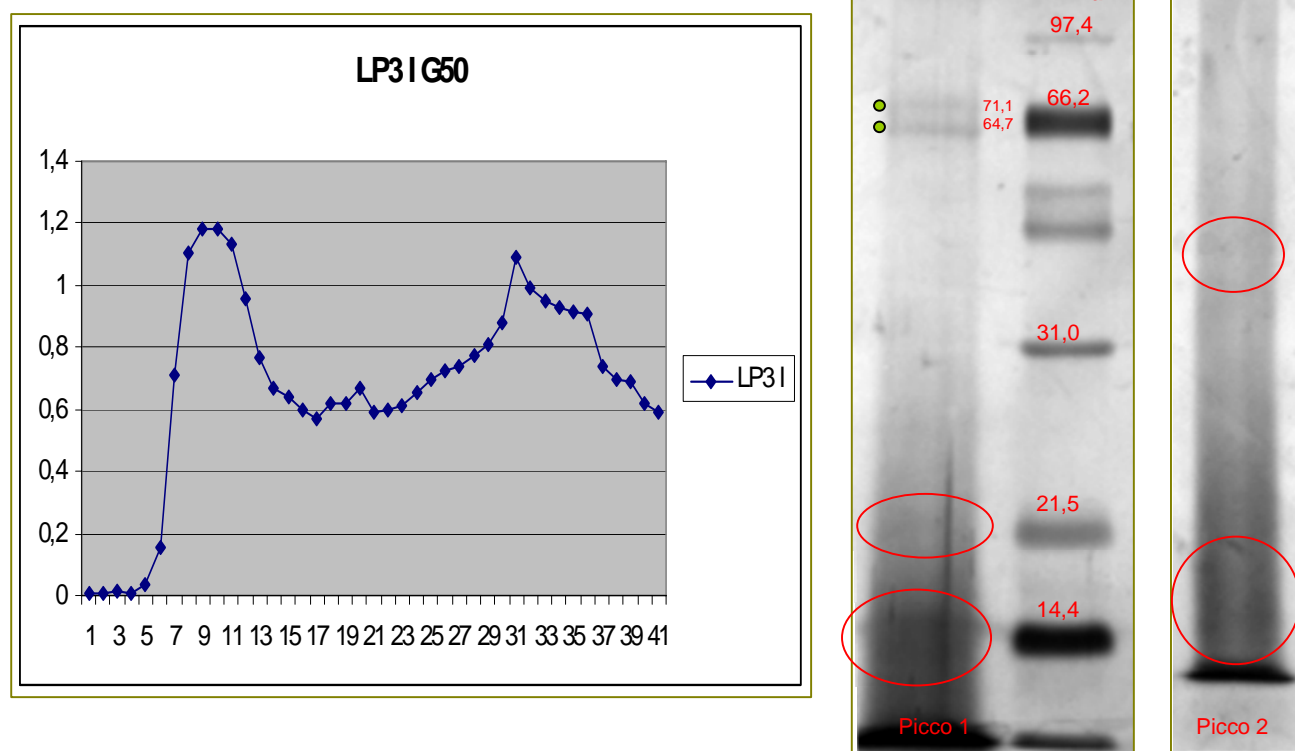


Fig. 22: Cromatografia G50 del campione LP1 (farina antica). A sinistra, lettura spettrofotometrica delle frazioni proteiche ottenute; a destra, analisi elettroforetica di ciascuna frazione. **M:** marcatore molecolare, valori espressi in kDa. I cerchi rossi indicano, la presenza di bande diffuse, i pallini bande discrete.

Estrazione per *Zea mays*:

Risultati analoghi si sono ottenuti nel caso dell'estrazione per mais. Anche in questo caso, i protocolli utilizzati sono stati quelli già testati sui semi antichi, ma i risultati, si sono rivelati piuttosto diversi. Nonostante i primi dati quantitativi fossero buoni (risultati non mostrati), la successiva analisi elettroforetica, mediante SDS-PAGE, non ha prodotto risultati soddisfacenti, nemmeno a seguito di lavaggio e precipitazione con acetone (v. Materiali e Metodi). La presenza di bande discrete, infatti, risultava ostacolata da una colorazione scura, presente in tutte le *lanes*, simile ad una “smear”. Anche in questo caso, si è tentato l'approccio cromatografico nella frazione SN2 (Gluteline solubili in sali) al fine di accertare la presenza di mais nella composizione alimentare delle farine prese in esame. A seguito di cromatografia per gli estratti proteici dei campioni LP2 e LP3 è stato possibile rilevare la presenza di due bande distinte ad alto e a basso peso molecolare.

Le figure 23 e 24 mostrano le frazioni ottenute a seguito della cromatografia per i campioni LP2 e LP3 e, di seguito, i risultati ottenuti a seguito di SDS-PAGE:

In tutte le frazioni ottenute per entrambi i campioni, sono rilevabili bande a basso peso molecolare, di circa 13 kDa e 13,5 kDa e di 10,5 kDa nel picco 1 del campione LP3 e nel picco 2 nel campione LP2. Nel campione LP3, inoltre, sono rilevabili bande diffuse, il cui peso molecolare medio è di circa 30,6 kDa, corrispondenti, molto probabilmente, alle bande discrete rilevabili anche nei semi antichi per la frazione SN2, il cui peso molecolare comprende dai 34,1 kDa ai 39,7 kDa nei campioni MA1 e MA2. Tre bande nette, inoltre, dal peso molecolare compreso tra i 36 kDa ed i 25 kDa (rispettivamente di 36,2-28,9-25,8 kDa) sono rilevabili nel secondo picco del campione LP2 e risultano abbastanza corrispondenti alle altrettanti bande visualizzabili nei campioni antichi. Nel medesimo campione, inoltre, sono evidenziabili due bande ad alto peso molecolare, di circa 60 kDa e 56,5 kDa.

Per quanto concerne, invece, la frazione SN2 ed SN4 (rispettivamente le gluteline non solubili in sali e la componente prolaminica, solubile in alcol) non è stata rilevata la presenza di alcuna banda discreta in nessuno dei campioni esaminati, nonostante ripetuti tentativi di purificazione e concentrazione dell'estratto proteico. Contrariamente alle frazioni precedentemente analizzate, nel caso della frazione SN4, che rappresenta le prolamine (zeine) solubili in alcol, non si nota, in seguito a corsa elettroforetica, la presenza di una colorazione scura lungo la *lane* e, quindi, la contaminazione di eventuali inquinanti nell'estratto proteico è stata esclusa. L'assenza delle zeine che, nel mais, rappresentano la componente prolaminica più abbondante e la meglio conservabile, come visto, anche nei semi antichi, pone dubbi sull'effettiva presenza di questo cereale negli alimenti analizzati.

Come per le faseoline, l'assenza delle zeine potrebbe essere imputabile al trattamento subito da queste farine anche se, in questo caso, la semplice cottura dell'alimento sembra poco plausibile, dal momento che alcuni dei semi antichi analizzati molto probabilmente erano stati cotti ma la presenza delle zeine è comunque rilevabile. A parità di metodo di estrazione, inoltre, sia per le farine che per i semi antichi la frazione SN2 risulta diversamente rappresentata nelle due tipologie di campioni analizzati.

Nel caso dei semi antichi, infatti, nei campioni più conservati si nota una buona omologia con il rispettivo moderno. Negli estratti proteici degli alimenti, invece, le frazioni proteiche conservate sono poche e per lo più localizzate a basso peso molecolare, tra i 30 kDa ed i 14 kDa e la diversità osservata potrebbe essere imputabile al tipo di campione preso in esame (alimento vs seme), alla sua conservazione ed ai diversi trattamenti subiti (cottura, essiccamento etc.).

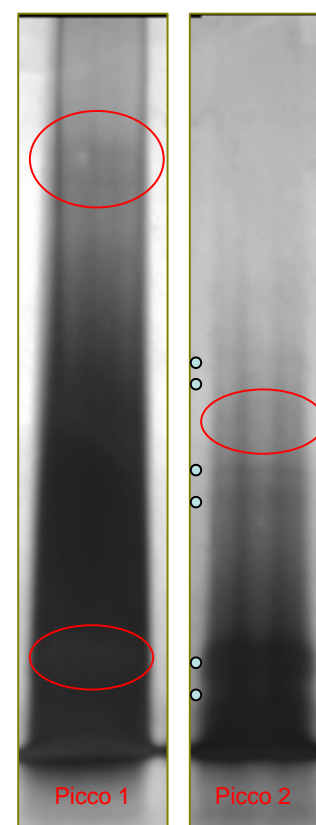
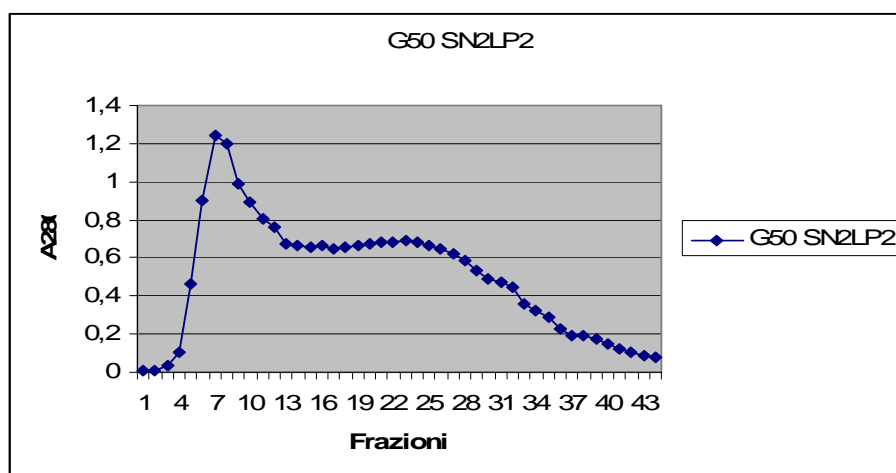


Fig. 23: Cromatografia G50 del campione LP2, frazione SN2 (farina antica). A sinistra, lettura spettrofotometrica delle frazioni proteiche ottenute; a destra, analisi elettroforetica di ciascuna frazione. **M:** marcatore molecolare, valori espressi in kDa. I cerchi rossi indicano, la presenza di bande diffuse, i pallini bande discrete.

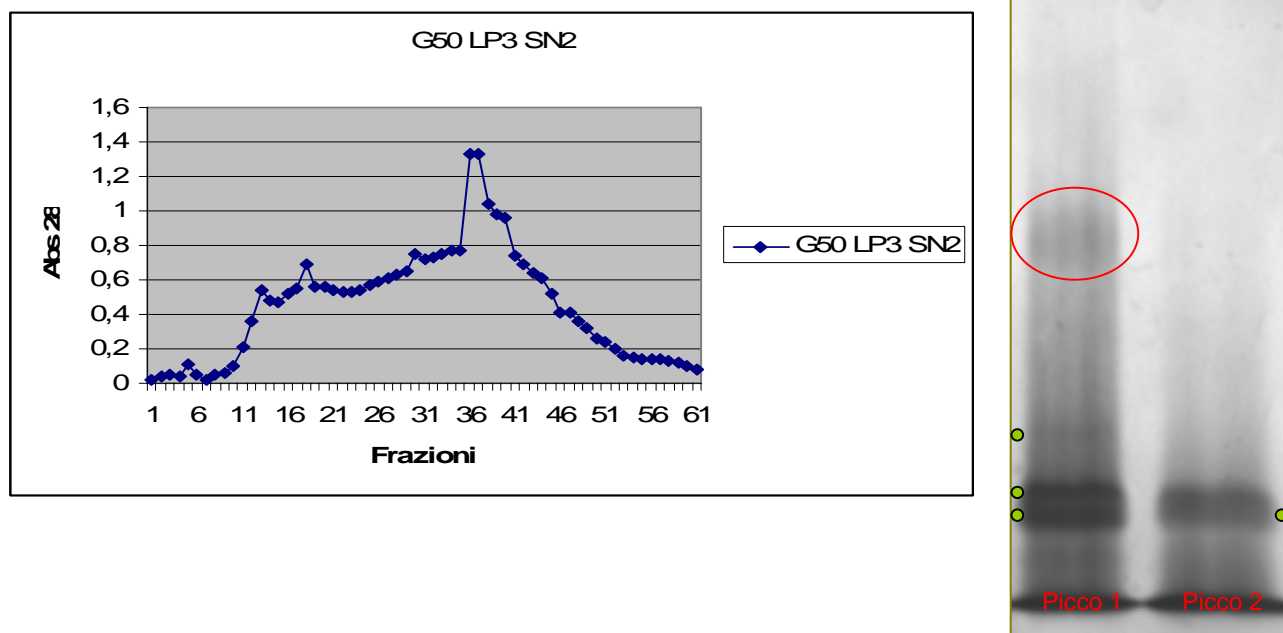


Fig. 24: Cromatografia G50 del campione LP3, frazione SN2 (farina antica). A sinistra, lettura spettrofotometrica delle frazioni proteiche ottenute; a destra, analisi elettroforetica di ciascuna frazione. **M:** marcatore molecolare, valori espressi in kDa. I cerchi rossi indicano, la presenza di bande diffuse, i pallini bande discrete.

Il DNA antico:

Allo scopo di ottenere una più certa identificazione delle sequenze analizzate e di tentare, inoltre un approccio filogenetico, si è provata l'estrazione del DNA da un campione di farina antica (LP 1) e dai semi di mais, sia antichi (MA1) che moderni (MM1). Si è provato, inoltre, ad estrarre il DNA totale anche da una delle accessioni di *Phaseolus vulgaris*, *pattern* Mesoamericano (PVM5).

Dei due metodi testati, *Kit DNA-Dynabeads* e il CTAB (Doyle e Doyle, 1987), (v. Materiali e Metodi), soltanto il secondo ha prodotto risultati soddisfacenti in tutti i campioni esaminati, antichi e moderni.

La fig. 25 mostra il DNA genomico estratto da semi attuale, di mais e fagiolo, e da una delle farine antiche oggetto di studio. Tutti i campioni, inoltre, sono stati testati con RNasi (v. Materiali e Metodi).

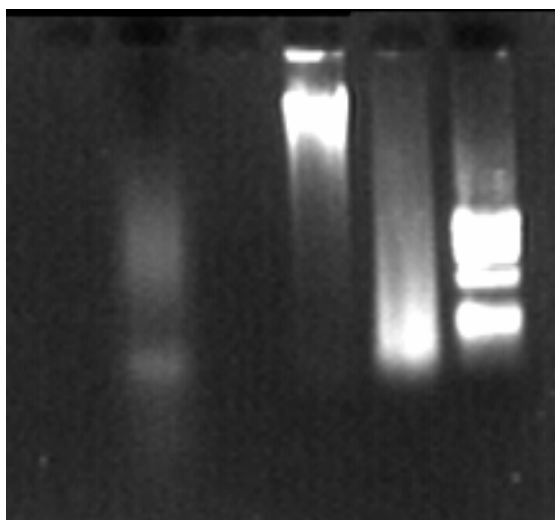


Fig. 25: DNA genomico totale, trattato con RNasi. Da sinistra a destra: **LP1** (farina antica), **MM1** (mais attuale, cv. “Giallo Morado”), **PVM5** (*P. vulgaris*, *pattern* Mesoamericano).

La figura sottostante, al contrario, mostra il DNA genomico totale estratto dalle accessioni moderne di *Phaseolus* spp. e dai campioni antichi di *Phaseolus* e *Zea mais*. In questo caso, non è stato utilizzato il trattamento con RNasi.

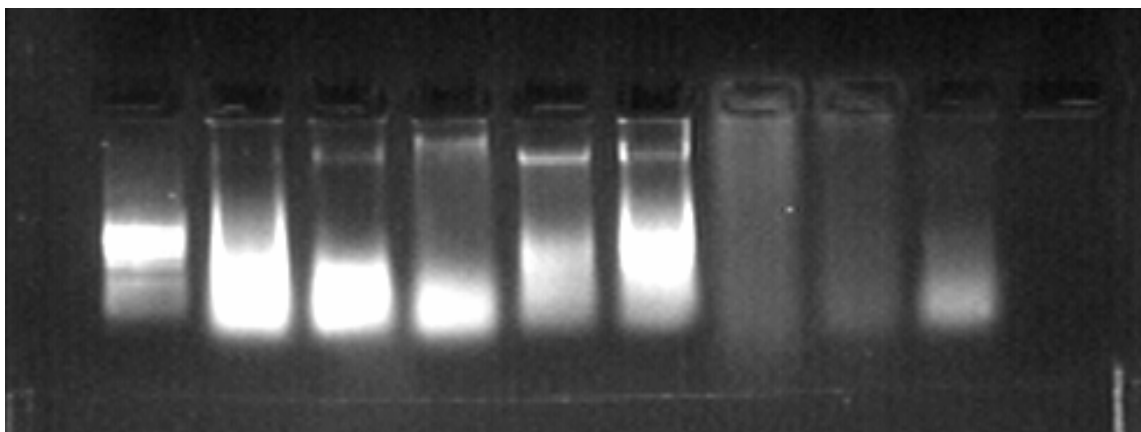


Fig. 26: DNA genomico estratto da semi attuali di *Phaseolus* spp. attuali ed antichi, oltre che da una accessione antica di mais antico. Nell'ordine, da sinistra a destra: **PVM4** (*Phaseolus vulgaris*, pattern andino); **PVM5** (*Phaseolus vulgaris*, pattern mesoamericano); **PLM1** (*P. lunatus*, var. Potato); **PLM2** (*P. lunatus* var. Big Lima); **PLM3** (*P. lunatus* var. Sieva); **PVA** (*P. vulgaris*, antico); **PLA** (*P. lunatus* antico); **MA1** (mais antico).

I risultati più soddisfacenti si sono ottenuti, per le accessioni moderne, nei semi di *Zea mais*. Al contrario il DNA genomico estratto da *Phaseolus* spp. presenta segni di degradazione, imputabili, probabilmente, al protocollo di estrazione (Fig. 25). Sulle base di questi dati, si è tentato di proseguire con l'amplificazione delle sequenze zeiniche di mais, che anche a livello proteico, avevano dato risultati soddisfacenti sia nei campioni antichi che moderni.

Il passo successivo pertanto, è stato quello di costruire *primers* per le subunità principali delle sequenze zeiniche (Z19 e Z22) risultate, a livello proteico, le meglio conservate. Considerata l'evidente degradazione del DNA nei campioni antichi, si sono costruiti 4 coppie di *primers* per ogni subunità zeinica in modo da amplificare, oltre che le intere sequenze, anche frammenti più piccoli, di circa 200 kb.

L'amplificazione, tuttavia, non ha dato risultati soddisfacenti, dal momento che, nei campioni antichi, non è stato rilevato alcun prodotto genico. Nella accessione moderna di mais, al contrario, tutti i *primers* testati hanno dato buoni risultati, visualizzabili nella sottostante figura:

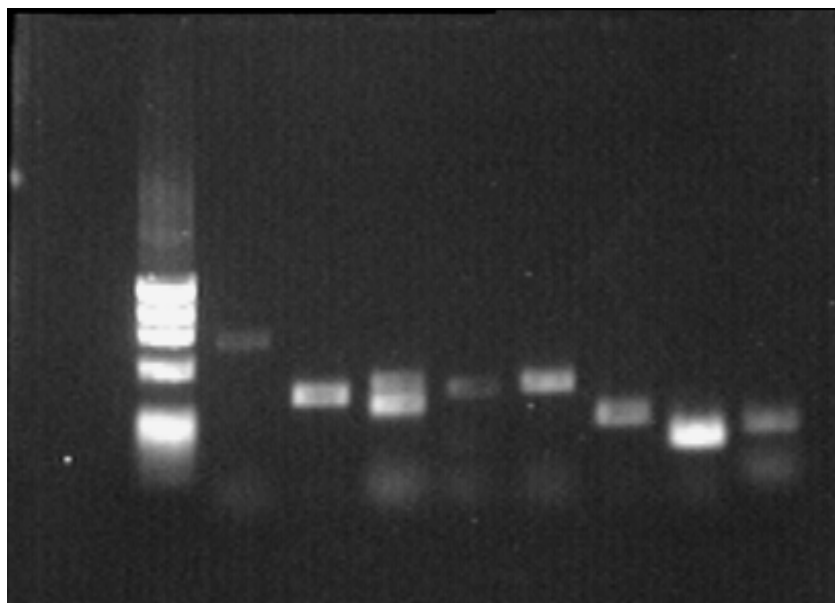


Fig. 27: amplificazione delle sequenze zeiniche in **MM1** (mais attuale, cv. “Giallo Morado”).

Da sinistra a destra, Z22 (sequenza totale e tre frammenti intermedi), Z19 (sequenza totale e tre frammenti intermedi).

L’assenza di risultati nei campioni antichi è probabilmente da imputare alla degradazione del DNA ed il passo successivo, pertanto, sarà quello di provare con coppie di *primers* che garantiscano un prodotto genico inferiore alle 200 kb, in modo da amplificare anche corti frammenti degradati.

Conclusioni

- Nei semi moderni di *Phaseolus* spp. oggetto del presente lavoro è stato possibile determinare sulla base delle sequenze faseoliniche, il *gene pool* di appartenenza per ciascuna delle accessioni studiate, confermando, come proposto da altri Autori, l'esistenza di due possibili centri di origine, il Mesoamericano e l'Andino, all'origine di questo genere.
- La similarità riscontrata, inoltre, tra i *pattern* proteici per le accessioni di *Phaseolus lunatus* e *Phaseolus vulgaris* prese in esame suggerisce una possibile vicinanza filogenetica tra queste specie.
- L'elevata diversità morfologica riscontrata sia nel *P. vulgaris* che nel *Phaseolus lunatus*, unita alla poca variabilità, riscontrata, invece, a livello proteico, lascia supporre che la base genetica sia ristretta e che la grande differenziazione fenotipica riscontrabile sia imputabile per lo più alle fasi di post-domesticazione, piuttosto che rappresentare una caratteristica delle popolazioni ancestrali.
- Per quanto riguarda l'analisi delle proteine di riserva nei semi e negli alimenti antichi, particolare attenzione, in prima analisi, è stata posta al metodo di estrazione. Tra quelli testati, il metodo a garantire migliori risultati quantitativi è stato il tampone Tris-HCl, per lo meno per quel che concerne l'analisi dei semi antichi. Nel caso delle farine, i risultati non sono stati così rilevanti, ma particolarmente utile è risultata la separazione cromatografica degli estratti proteici che ha permesso di risolvere i problemi relativi alla purezza del campione, migliorando la visualizzazione delle componenti proteiche su gel.
- Le accessioni antiche di *Phaseolus* spp. analizzate, sono risultate le peggio conservate a livello di degradazione proteica e, generalmente, una colorazione scura predomina lungo tutte le *lanes*. Bande discrete ad alto peso molecolare, tuttavia, sono rilevabili in una delle accessioni studiate (PVA5) e probabilmente ascrivibili alle subunità leguminiche. Sono presenti, inoltre, bande a più basso peso molecolare minore, intorno ai 45 kDa, relazionabili alle *lectin related proteins*, e componenti a più basso peso molecolare comprese in un *range* tra i 31 kDa ed i 26 kDa e tra i 21,5 kDa ed i 14,4 kDa. Sulla base dei soli pesi molecolari, tuttavia, non è possibile identificare il *pool* genico di appartenenza, Mesoamericano o Andino, in quanto il peso molecolare delle accessioni studiate non trova un'esatta corrispondenza con i rispettivi campioni attuali.
- Le accessioni di *Phaseolus lunatus* prese in esame, al contrario, hanno mostrato *pattern* elettroforetico simile indipendentemente dal grado di conservazione e dalla loro presunta

datazione. Componenti ascrivibili al gruppo delle legumine-simili e a quelle viciliche sono state rilevabili in ogni campione e, sulla base del peso molecolare, è stato possibile stabilire il *pool* genico di appartenenza. Nonostante alcuni dei campioni presi in esame siano varietà a seme piccolo, più tipiche dell'area Mesoamericana, tutte le accessioni sembrano appartenere al *pool* Andino, mostrando una buona omologia con la varietà Big Lima attuale.

- I dati, pertanto, confermano che le varietà a seme piccolo erano presenti nel territorio andino già nel 900 a.C., ma, trattandosi di forme domestiche, resta da chiarire se si siano originate proprio nell'area andina o se siano state introdotte successivamente, a partire dalle regioni mesoamericane.
- Per quanto concerne, invece, le accessioni antiche di *Zea mays* prese in esame, la frazione zeinica si è rilevata la meglio conservata in tutti i campioni, mostrando una buona omologia con i campioni moderni. La subunità α risulta essere la meglio conservata, mentre la subunità γ è presente solo in due delle accessioni esaminate. Le restanti frazioni (SN2 e SN5, la componente glutelinica, rispettivamente, solubile in sale o alcol insolubile), al contrario, sono diversamente rappresentate ed i campioni MA1, MA2 MA3, risultano essere quelli meglio conservati, dal momento è possibile rilevare la presenza di bande nette lungo tutta la *lane*, principalmente localizzate a basso peso molecolare. Nei rimanenti campioni, si nota per lo più una colorazione scura lungo tutta la *lane* e tracce di bande discrete intorno ai 14,5 kDa. La scarsa conservazione delle componenti gluteliniche riscontrata in alcuni campioni potrebbe essere imputabile anche al tipo di trattamento subito (cottura, essiccazione, fermentazione), considerata l'importanza alimentare di questo cereale nell'alimentazione precolombiana.
- Nel caso delle farine, le estrazioni differenziali hanno permesso di rilevare la presenza di *Phaseolus* spp., constatabile, solo dopo cromatografia, dalla presenza di bande discrete, ad alto e a basso peso molecolare. Al contrario, l'estrazione per mais non ha prodotto risultati certi in quanto la maggiore componente proteica, quella zeinica, risulta assente. Componenti a basso peso molecolare, invece, sono stati evidenziati nella frazione SN2 (gluteline solubili in sali). Anche in questo caso, l'assenza di alcune componenti proteiche potrebbe essere imputabile al tipo di campione (si tratta infatti di alimenti) ed al trattamento subito.
- I dati riscontrati nel presente lavoro dovranno essere successivamente riconfermati tramite sequenziamento delle subunità proteiche meglio conservate o, ad esempio, *immunoblotting* con anticorpi specifici per le frazioni zeiniche o globuliniche.

Bibliografia:

- Altschuler X, Galili Y** (1994). Role of conserved cysteines of a wheat gliadin in its transport and assembly into protein bodies in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 269: 6677-6682
- Altschuler Y, Harel R, Galili G** (1993). Role of the N- and C- terminal regions of wheat γ -gliadin in its transport via endoplasmic reticulum of *Xenopus* oocytes. *The Plant Cell* 5: 443-450
- Bagga S, Adams H, Rodriquez FD, Kemp JD, Sengupta-Gopalan C** (1997). Co-expression of the maize δ - and β - zein genes results in stable accumulation of δ -zein in ER-derived protein bodies formed by β -zein. *The Plant Cell* 9: 1683-1696
- Bailey CJ, Cobb A, Boulter D** (1970). A cotyledon slice system for the autoradiographic study of the synthesis and intracellular transport of the seed storage proteins of *Vicia faba*. *Planta* 95: 103-118
- Bartels D, Thompson RD** (1986). Synthesis of messenger-RNAs coding for abundant endosperm proteins during wheat grain development. *Plant Science* 46:117-125
- Barton-Wright EC, Boot RG, Pringle WJS**(1944). Analysis of barley from King Tutankhamen's tomb. *Nature*, 153-288
- Baudoin JP, Maquet A** (1999). Improvement of protein and amino acid contents in seeds of food legumes. A case of study in *Phaseolus*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 3: 220-224
- Beccari** (1745). De frumento. De *Bononiensi Scientiarum et Artium Instituto atque Accademia Commentarii*, II. Part I, 122-127
- Beebe S, Rengifo E, Gaitan M, Duque C, Tohme J** (2001). Diversity and origin of Andean landraces of common bean. *Crop Science* 41: 854-862
- Beebe S, Skroch PW, Tohme J, Duque C, Pedraza F, Nienhuis J** (2000). Structure of genetic diversity among common bean landraces of Middle American origin based on correspondence analysis of RAPD. *Crop Science* 40: 264-273
- Beebe S, Toro O, Gonzalez AV, Chacon MI, Debouck DG**(1997). Wild-weed-crop complexes of common beans (*Phaseolus vulgaris* L. Fabaceae) in the Andes of Perú and Colombia, and their implications for conservation and breeding. *Genet Res Crop Evol* 44: 73-91
- Bechtel DB, Wilson JD, Shewry PR** (1991). Immunocytochemical localization of the wheat storage protein triticin in developing endosperm tissue. *Cereal Chem* 68: 573-577
- Belanger F, Kriz AL**(1991).: Molecular basis for allelic polymorphism of the maize *Globulin-1* gene. *Genetics* 129: 863-872
- Benson L, Cordell L, Vincent K, Taylor H, Stein J, Farmer GL, Futa K** (2003). Ancient maize from Chacoan great houses: where was it grown?. *PNAS* 100, 13111-13115

- Benz BF** (2001). Archaeological evidence of teosinte domestication from Guilà Naquitz, Oaxaca. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 2104-2106
- Bollini R, Carnevale E, Campion B** (1999). Removal of antinutritional factors from bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 3: 217-219
- Bollini R, Chrispeel MJ** (1978). Characterization and subcellular localization of vicilin and phytohemagglutinin, the two major reserve proteins of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 142: 291-298
- Burgess SR, Shewry PR** (1986). Identification of homologous globulins from embryos of wheat, barley, rye and oats. *Journal of Experimental Botany* 37: 1863-1871
- Brown TA, Allaby RG, Brown KA, O'Donoughe K, Sallares R** (1994). DNA in wheat seeds from European archaeological sites. *Cell Mol Life Sci* 50: 571-575
- Caicedo AL, Gaitan E, Duque MC, Toro Chica O, Debouck DG, Tohme J** (1999). AFLP fingerprinting of *Phaseolus lunatus* L. and related wild species from South America. *Crop Science* 39: 1497-1506
- Casey R**: Distribution and some properties of seed globulins. *Seed proteins*, 159-169: **1999**.
- Casey R, Domoney C** (1984). The genetics of legume storage proteins. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 304: 349-358
- Cattan-Toupance I, Michalakakis Y, Neema C** (1998). Genetic structure of wild bean populations in their South-Andean centre of origin. *Theor Appl Genet* 96: 844-851
- Chacòn MI, Pickersgill SB, Debouck DG** (2005). Domestication patterns in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the origin of the Mesoamerican and Andean cultivated races. *Theor Appl Genet* 110: 432-444
- Choi SB, Wang C, Muench DG, Ozawa K, Franceschi VR, Okita TW** (2000). Messenger RNA targeting of rice seed storage proteins to specific ER subdomains. *Nature* 407: 765-767
- Chrispeels MJ** (1984). Biosynthesis, processing and transport of storage proteins and lectins in cotyledons of developing legume seeds. *Phil. Trans. Soc. Lond.* 304: 309-322
- Clark RM, Linton E, Messing J, Doebley JF** (2004). Pattern of diversity in the genomic region near the maize domestication gene *tb1*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 700-707
- Cobo** (1891). Historia del Nuevo Mundo. Sociedad de Bibliofolios Andaluces, 4 vol; Ed. Rasco, Sevilla; **Piacenza L** Le offerte di cibo nelle tombe preincache. *Saggio presentato al XXVIII Congresso Internazionale di Americanistica, sessione "Alimentazione e cultura nell'America Indigena: archeologia, storia e antropologia"*, (2006) (in corso di pubblicazione).
- Coleman CE, Herman EM, Takasaki K, Larkins BA** (1996). The maize γ -zein sequesters α -zein and stabilizes its accumulation in protein bodies of transgenic tobacco endosperm. *Plant Cell* 8: 2335-2345

- Coleman CE, Larkins BA** (1999). The prolamin of maize, *In: Shewry PR, Halford NG* (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J. of Exptl Bot* 53: 947-958
- Debouck DG, Linan Jara JH, Campana Sierra A, de la Cruz Rojas JH** Observation on the domestication of *Phaseolus lunatus* L. *Plant Gen Res Newslett* 70: 26-32
- Derbyshire E, Harris N, Boulter D, Jope M** (1977). The extraction, composition and intra-cellular distribution of protein in early maize grains from archaeological site in N.E. Arizona. *New Phytol.* 78: 499-504
- Doley J, Shuler MA, Godette WD, Zanger V, Beachy R, Slinghtom J**(1986). The glycosylated seed protein of *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris*. *J. Biol Chem.* 261: 9228-9238
- Duffus CM, Cochrane MP**(1992). Grain structure and composition *In: Shewry, Halford* (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J Exptl Bot* 53: 947-958
- Durante M, Bernardi R, Rollo F, Amici A** (1988). A comparison of storage proteins in modern and mummified maize (*Zea mais*) seeds. *Genet. Agr.* 42: 446-447
- Esquivel M, Castineiras L, Lioi L, Hammer K** (1993). The domestication of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Cuba: morphological and biochemical studies. *Plant Genetic Resource Newsletters* 91/92: 21-22
- Eubanks MW** (1997). Molecular analysis of crosses between *Tripsacum dactyloides* and *Zea diploperennis* (Poaceae). *Theoretical and Applied Genetics* 94: 702-712
- Fofana B, Baudoin JP, Vekemans X, Debouck DG, du Jardin P** (1999). Molecular evidenced for an Andean origin and a secondary gene pool for the Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) using chloroplast DNA. *Theor Appl Genet* 98: 202-212
- Fofana B, Vekemans X, du Jardin P, Baudoin JP** (1997). Genetic diversity in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as revealed by RAPD markers. *Euphytica* 95: 157-165
- Galinat** (1988). Corn and crop improvement. *Eds. Sprague; In: Matsuoka Y, Vigouroux X, Goodman MM, Sanchez JC, Buckler E, Doebley J* (2002). A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Science* 99: 6080-6084
- Gallili G** (1997). The prolamin storage protein of wheat and its relatives, *In: Shewry PR, Halford NG* (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany* 53: 947-958
- Galván MZ, Aulicino MB, García Medina S, Balatti PA** (2001). Genetic diversity among Northwestern Argentinian cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as revealed by RAPD markers. *Genetic Resource and Crop Evolution* 48: 251-260
- de la Gasca** (1551-1553): Descripción del Perú. Ed. Joseph M. Barnadas, Centro Estudio Andino “Bartolomé de Las Casas” Cuzco, Perú; (1998). *In: Piacenza L* (2006) Le offerte di cibo nelle

tombe preincaiche. *Saggio presentato al XXVIII Congresso Internazionale di Americanistica, sessione "Alimentazione e cultura nell'America Indigena: archeologia, storia e antropologia"*

Geli MI, Torrent M, Ludevid D (1994). Two structural domains mediate two sequential events in γ -zein targeting: protein endoplasmatic reticulum retention and protein body formation. *The Plant Cell* 3: 1207-1219

Gepts P (1988). Phaseolin as an evolutionary marker, *In: Vargas, Macaya, Baudoin, Rocha* (2000). Variation in the content of phaseolin in wild populations of lima beans (*Phaseolus lunatus* L.) in the Central Valley of Costa Rica. *Plant Genetic Resource Newsletters* 121: 53-58

Gepts P, Debouk DG (1991). Origin, domestication and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *In: Chacòn MI, Pickersgill SB, Debouk DG* (2005). Domestication patterns in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the origin of the Mesoamerican and Andean cultivated races. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 432-444

Gepts P, Osborn TC, Rashka K, Bliss FA (1986). Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): evidence for multiple centre of domestication. *Economic Botany* 40: 451-468

Gibbs PE, Strongin KB, Mc-Pherson A (1989). Evolution of legume seed storage proteins: a domain common to legumins and vicilins is duplicated in vicilins. *Molecular Biology Evolution* 6: 614-623

Giese H, Hopp E (1984). Influence of nitrogen nutrition on the amount of hordein, protein Z and β -amylase messenger RNA in developing endosperm of barley. *In: Shewry PR, Halford NG* (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany* 53: 947-958.

Goloubinoff P, Paabo S, Wilson AC (1993). Evolution of maize inferred from sequence diversity of an *Adh2* gene segment from archaeological specimens. *Proceedings of the National Academy of Science* 90: 1997-2001

Halford NG, Forde J, Shewry PR, Kreis M (1989). Functional analysis of the upstream region of a silent and an expressed member of a family of a wheat seed protein genes in transgenic tobacco. *Plant Science* 62: 207-216

Hamelryck TW, Dao-Thi MH, Poortsmans F, Chrispeels MJ, Wyns L, Loris R (1996). The cristollographic structure of phytoemagglutinin-L. *Journal of Biological Chemistry* 271: 20479-20485

Hammond-Kosak MCU, Holdsworth MJ, Bevan MW (1993). *In vivo* footprinting of a low molecular weight glutenin gene (LMWG-1D1) in wheat endosperm. *The EMBO Journal* 12: 545-554

Harris N, Boulter D (1976). Protein body formation in cotyledons of developing cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Ann. Bot.* 40: 739-744 *In: Hoh B, Hinz G, Jeong BK, Robinson DG* (1995). Protein storage vacuoles form de novo during pea cotyledon development. *Journal of Cell Science* 108: 229-310

- Heck GR, Chamberlain AK, Ho DTH** (1993). Barley embryo globulin 1 gene, *Beg1*: characterization of cDNA chromosome mapping and regulation of expression. *Molecular and General Genetics* 239: 209-218
- Hilton H, Gaut BS** (1998). Speciation and domestication in maize and its relatives: evidence from the *globulin -I* gene. *Genetics* 150: 863-872
- Hoh B, Hinz G, Jeong BK, Robinson DG** (1995). Protein storage vacuoles form de novo during pea cotyledon development. *Journal of Cell Science* 108: 229-310
- Horikoshi M, Morita Y** (1975). Localization of γ -globulin in rice seed and changes in γ -globulin content during seed development and germination. *Agricultural and Biological Chemistry* 39: 2309-2314
- Imbrie-Milligan C, Datta P, Goldstein IJ** (1989). Isolation and characterization of a cDNA clone encoding the Lima Bean lectin. *The Journal of Biological Chemistry* 28:16793-16797
- Jaenicke-Despres V, Buckler S, Smith BD, Gilbert MTP, Cooper A, Doebley J, Paabo S** (2003). Early allelic selection in maize as revealed by ancient DNA. *Science* 302: 1206-1208
- Kami J, Becerra-Velásquez V, Debouck DG, Gepts P** (1995). Identification of presumed ancestral DNA sequences of phaseolin in *Phaseolus Vulgaris*. *Proceedings of the National Academy of Science* 92: 1101-1104
- Kaplan L, Lynch TF** (1999). *Phaseolus* (Fabaceae) in archaeology: AMS radiocarbon dates and their significance for pre-Colombian agriculture. *Economic Botany* 53: 261-272
- Kreis, Forde, Rahman, Miflin, Shewry PR** (1985). Molecular evolution of seed storage proteins of barley, rye and wheat. *Journal of Molecular Biology* 183: 499-502
- Krishnan HB, Franceschi VR, Okita TW** (1986). Immunochemical studies on the role of the Golgi complex in protein body formation in rice seeds. *Planta* 169: 471-480
- Kriz AL**: 7S globulin of cereals, (1999). In: **Shewry PR, Halford NG** (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany* 53: 947-958
- Lamacchia C, Shewry PR, Di Fonzo N, Foryth JL, Harris N, Lazzeri PA, Napier JA, Halford NG, Barcelo P** (2001). Endosperm-specific activity of a storage protein gene promoter in transgenic wheat seed. *Journal of Experimental Botany* 52: 243-250
- Leite A, Neto GC, Vettore AL, Yunes J, Arruda P** (1999). The prolamins of sorghum, *Coix* and millets, In: **Shewry PR, Halford NG** (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany* 53: 947-958
- Lending CR, Chesnut RS, Shaw KL, Larkins BA** (1989). Immunolocalization of avenin and globulin storage proteins in developing endosperm of *Avena sativa* L. *Planta* 178: 315-324
- Li X, Zhang WY, Gillikin JW, Boston RS, Franceschi VR, Okita TW** (1993). Rice prolamins protein body biogenesis: a Bi-P mediated process. *Science* 262: 1054-1056

- Lioi L** (1994). Morphotype relationships in Lima beans (*Phaseolus lunatus* L.) deduced from variation of the evolutionary marker phaseolin. *Genetic Resource and Crop Evolution* 41: 81-85
- Lioi L, Lotti C, Galasso I** (1998). Isozyme diversity, RFLP of the rDNA and phylogenetic affinities among cultivated Lima beans, *Phaseolus lunatus* (Fabaceae). *Pl. Syst. Evol.* 213: 153-164
- Lioi L, Sparvoli F, Bollini R** (1999). Variation and genomic polymorphism of lectin-related proteins in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) seeds. *Genetic Resource and Crop Evolution* 46: 157-182
- Longhera M, Alva W** (2004). Le grandi civiltà del passato; Antico Perù. *Ed. White Star*
- Maciel FL, Gerald LTS, Echeverrigaray S** (2001). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers variability among cultivars and landraces of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) of South-Brazil. *Euphytica* 120: 257-263
- Maquet A** Study on genetic diversity of the legume *Phaseolus lunatus* L. using morphophysiological and protein markers. These de Doctorat, Gembloux, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques Belgium, 188p. *In: Vargas EM, Macaya G, Baudoin JP, Rocha CJ* (2000). Variation in the content of phaseolin in wild populations of lima beans (*Phaseolus lunatus* L.) in the Central Valley of Costa Rica. *Plant Genetic Resource Newsletters* 121: 53-58
- Maquet A, Vekemans X, Baudoin JP** (1999). Phylogenetic study on wild allies of Lima bean, *Phaseolus lunatus* (Fabaceae), and implications on its origin. *Plant Syst, Evol.* 218: 43-54
- Maquet A, Zoro Bi I, Delvaux M, Wathelet B, Baudoin JP** (1997). Genetic structure of Lima bean base collection using allozyme markers. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 980-991
- Marechal R, Mascherpa JM, Stainer F** (1978). Etude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces des genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base de données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique. *Conservatoire et Jardin Botaniques de Genève, Suisse, In: Maquet A, Vekemans X, Baudoin JP* (1999). Phylogenetic study on wild allies of Lima bean, *Phaseolus lunatus* (Fabaceae), and implications on its origin. *Plant Syst, Evol.* 218: 43-54
- Matsuoka Y, Vigouroux, Y Goodman MM, Sanchez JG, Buckler E, Doebley J** (2002). A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Science* 99: 6080-6084
- Métais I, Aubry C, Hamon B, Jalouzot R, Peltier D** (2000). Description and analysis of genetic diversity between commercial bean lines (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 101: 1207-1214
- Mirkov TE, Wahlstrom JM, Hagiwara K, Finardi-Filho F, Kjemtrup S, Chrispeels MJ** (1994). Evolutionary relationships among proteins in the phytohemagglutinin-arcelin- α -amylase inhibitor family of the common bean and its relatives. *Plant Molecular Biology* 26: 1103-1113
- Moraes RA, Sales MP, Pinto MSP, Silva LB, Oliveira AEA, Machado OLT, Fernandes KVS, Xavier-Filho JX** (2000). Lima bean (*Phaseolus lunatus*) seed coat phaseolin is detrimental to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33: 191-198

- Muench DG, Ogawa M, Okita TW** (1999). The prolamins of rice, *In: Shewry, Halford* (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany* 53: 947-958
- Muller M, Knudsen S** (1993). The nitrogen response of a barley C-hordein promoter is controlled by positive and negative regulation of the GCN4 and endosperm box. *The Plant Journal* 4: 343-355
- Neumann D, Weber F** (1978). Formation of protein bodies in ripening seeds of *Vicia faba* L. *Biochemical Physiology Pflanzen* 173: 167-180 *In Hoh B, Hinz G, Jeong DK, Robinson BG* (1995). Protein storage vacuoles form de novo during pea cotyledon development *Journal of Cell Science* 108: 229-310
- O'Donoughe K, Brown TA, Carter JF, Evershed RP** (1994). Detection of nucleotide bases in ancient seeds using gas chromatography/mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry/ mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 8: 503-508
- Orefici G** (1992). Nasca: Archeologia per una ricostruzione storica. Ed. Jaka Book, Milano
- Osborne TB** (1924). The vegetable proteins. 2nd Ed. Langmans, Green & Co., London;
- Paolozzo A, Jaffè WG** (1965). Reacciones inmunologicas de extractos de semillas de habichuelas recuperadas de tumbas prehistoricas en el Peru. *Boletin de la Sociedad Quimica del Peru* 31: 1-5
- Papa R, Acosta J, Delgado-Salinas A, Gepts P** (2005). A genome-wide analysis of differentiation between wild and domesticated *Phaseolus vulgaris* from Mesoamerica. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 1147-1158
- Papa R, Gepts P** (2003). Asymmetric gene flow and differential geographical structure of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mesoamerica. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 239-250
- Piacenza L** (2001). I resti botanici del sito archeologico di Cahuachi (Nazca). *Informatore Botanico Italiano* 33: 51-55; Società Botanica Italiana, Firenze
- Piacenza L** (2004) Tradiciones gastronómicas en diferentes Culturas precolombinas del sur perdano. *In: Quaderni di Thule, Rivista italiana di studi americanistici*, IV, 47-52, atti del Convegno Internazionale di Americanistica, Perugia, del Centro Studi Americanistici "Circolo Amerindiano", ed. ARGO, Lecce (2004).
- Piacenza L** (2005). Las plantas en las ofrendas funeraria CHIRIBAYA *In: Quaderni di Thule, rivista italiana di studi americanistici*, III-1, 237-244, atti del XXV Convegno del Centro Studi Americanistici "Circolo Amerindiano", ed. ARGO, Lecce
- Piacenza L** (2006) Le offerte di cibo nelle tombe preincaiche. *Saggio presentato al XXVIII Congresso Internazionale di Americanistica, sessione "Alimentazione e cultura nell'America Indigena: archeologia, storia e antropologia"*
- Piperno DR, Flannery KV** (2001) The earliest archaeological maize (*Zea mays* L.) from highland Mexico: new accelerator mass spectrometry dates and their implications. *Proceedings of the National Academy of Science* 98: 2101-2103

- Piperno DR, Ranere AJ, Holst I, Hansell P** (2000). Starch grain reveal early root crop horticulture in the Panamian Tropic forest. *Nature* 407: 894-897
- Piperno DR, Weiss E, Holst I, Nadel D** (2004). Processing of wild cereal grains in the upper palaeolithic revealed by starch grain analysis. *Nature* 430: 670-673
- Pueyo JJ, Hunt DC, Chrispeels J** (1993). Activation of bean (*Phaseolus vulgaris*) α -amylase inhibitor requires proteolytic processing of the pro-protein. *Plant Physiology* 101: 1341-1348
- Quayle T, Feix G** (1992). Functional analyses of the -300 region of maize zein genes. *Molecular and General Genetics* 231: 369-374
- Rollo F, Venanzi FM, Amici A** (1991). Nucleic acids in mummified plant seeds: biochemistry and molecular genetics of pre-Columbian maize. *Genetic Resources* 58: 193-201
- Sathe J, Desphande M, Salunkhe W** (1984). Dry beans of *Phaseolus*. A review. Part 1. Chemical composition proteins. *Critical Reviews of Food Science* 20: 1-45
- Shewry PR** (1999). The synthesis, processing and deposition of gluten proteins in developing wheat grain. *Cereal Foods World* 44: 587-589
- Shewry PR, Kirkman MA, Burgess SR, Festenstein GN, Mifflin BJ** (1982). A comparison of the protein and of the amino acid composition of old and recent barley grain. *New Phytol.* 90: 455-466
- Shewry PR, Halford NG** (2002). Cereal seed storage proteins: structure, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany* 53: 947-958
- Shewry PR, Tatham AS** (1990). The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *Journal of Cereals Science* 25: 207-227
- Shotwell MA** (1999). Oat globulins. *Seed proteins*, 389-400;
- Sing NK, Shepherd KW** (1985). The structure and genetic control of a new class of disulphide-linked proteins in wheat endosperm. *Theoretical and Applied Genetics* 71: 79-92
- Sing NK, Shepherd KW, Langridge P, Gruen LC, Skeritt JH, Wrigley CW** (1988). Identification of legumin-like-proteins in wheat. *Plant Molecular Biology* 22: 227-237
- Singh SP** (2001). Broadening the genetic base of common bean cultivars. *Crop Science* 41:1659-1675
- Singh SP, Nodali, Gepts P** (1991). Genetic diversity in cultivated common bean: I Alloenzymes. *Crop Science* 31: 19-23
- Slightom JL, Drong RF, Klassy RC, Hoffman LM** (1985). Nucleotide sequences from phaseolin cDNA clones: the major storage proteins from *Phaseolus vulgaris* are encoded by two unique gene families. *Nucleic Acid Research* 13: 6483-6498
- Smith BD** (2001). Documenting plant domestication: the consilience of biological and archaeological approaches. *Proceedings of the National Academy of Science* 98: 1324-1326

- Sparvoli F, Bollini R** (1998). Arcelin in wild bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds: sequence of arcelin 6 shows it is a member of the arcelins 1 and 2 subfamily. *Genetic Resource and Crop Evolution* 45: 383-388
- Sparvoli F, Daminati, Lioi, Bollini R** (1996). *In vivo* endoproteolitically cleaved phaseolin instabel accumulates in developing *Phaseolus lunatus* seeds. *Biochemical and Biophysical Acta* 1292: 12-22 In: **Vargas EM, Macaya G, Baudoin JP, Rocha CJ** (2001). Case studies on breeding systems and its consequences for germoplasm conservation: 3. Electrophoretic mobility of phaseolins in wild populations of Lima Beans (*Phaseolus Lunatus* L.) in the Central Valley of Costa Rica. *Genetic Resource and Crop Evolution* 48: 109-120
- Sparvoli F, Lanave C, Cantucci A, Bollini R, Lioi L** (2001). Lectin and Lectin-related proteins in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) seeds: biochemical and evolutionary studies. *Plant Molecular Biology* 45: 587-597
- Spencer D** (1984). The physiological role of storage proteins in seeds. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 304: 275-285
- Tecsi L, Darlington HF, Harris N, Shewry PR** (2000). Patterns of proteins deposition and distribution in developing and mature barley grain, In: **Shewry PR, Halford NG** (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany* 53: 947-958
- Thomas MS, Flavell RB** (1990). Identification of an enhancer element for the endosperm-specific expression of high molecular weight glutenin. *The plant Cell* 2: 1171-1180
- Tohme M, Gonzalez DO, Beebe S, Duque MC** (1996). AFLP analyses of gene pools of wild bean core collection. *Crop Science* 36: 1375-1384
- Torrent M, Geli MI, Ruiz-Avila L, Canals J, Puigdomènech P, Ludevid MD** (1994). Role of structural domains for maize γ -zein retention in *Xenopus* oocytes. *Planta* 192: 512-518
- Yupsanis T, Burgess SR, Jackson PJ, Shewry PR** (1990). Characterization of the major protein component from aleurone cells of barley *Hordeum vulgare* L.. *Journal of Experimental Botany* 41: 385-392
- Vargas EM, Macaya G, Baudoin JP, Rocha OJ** (2000). Variation in the content of phaseolin in wild populations of lima beans (*Phaseolus lunatus* L.) in the Central Valley of Costa Rica. *Plant Genetic Resource Newsletters* 121: 53-58
- Vargas EM, Macaya G, Baudoin JP, Rocha OJ** (2001). Case studies on breeding systems and its consequences for germoplasm conservation: 3. Electrophoretic mobility of phaseolins in wild populations of Lima Beans (*Phaseolus Lunatus* L.) in the Central Valley of Costa Rica. *Genetic Resource and Crop Evolution* 48: 109-120
- de la Vega** (1977). Commentari Reali degli Incas, *Rusconi*, Milano; In: **Piacenza** (2006).: Le offerte di cibo nelle tombe preincaiche. *Saggio presentato al XXVIII Congresso Internazionale di Americanistica, sessione "Alimentazione e cultura nell'America Indigena: archeologia, storia e antropologia"*

Villalobos RA, UgaldeWGG, Chacon FC, Trejos PS, Debouck DG (2001). Observation on the geographical distribution, ecology and conservation status of several *Phaseolus* bean species in Costa Rica. *Genetic Resource and Crop Evolution* 48: 221-232

Yamagata H, Tanaka K (1986). The site of synthesis and accumulation of rice storage proteins. *Plant and Cell Physiology* 27: 973-975

Wang RL, Stec A, Hey J, Lukens L, Doebley J (1999). The limits of selection during maize domestication. *Nature* 398: 236-239

Whitt SR, Wilson LM, Tenaillon MI, Gaut BS, Buckler ES (2002). Genetic diversity and selection in the maize starch pathway. *Proceedings of the National Academy of Science* 99: 12959-12962

Zakharov A, Carchilan M, Stepurina T, Rotari V, Wilson K, Vaintraub I (2004). A comparative study of the role of the mayor proteinases of germinated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seeds in then degradation of their storage proteins. *Journal of Experimental Botany* 406: 2241-2249

Zeven AC, Doekes GJ , Kislev M (1975). Proteins in old grains of *Triticum sp.* . *Journal of Archaeological Scence* 2: 209-213

Zoro I, Maquet A, Degreef J, Wathelet B, Baudoin JP (1997). Sample size for collecting seeds in germoplasm conservation: the case of the Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 97: 187-194